

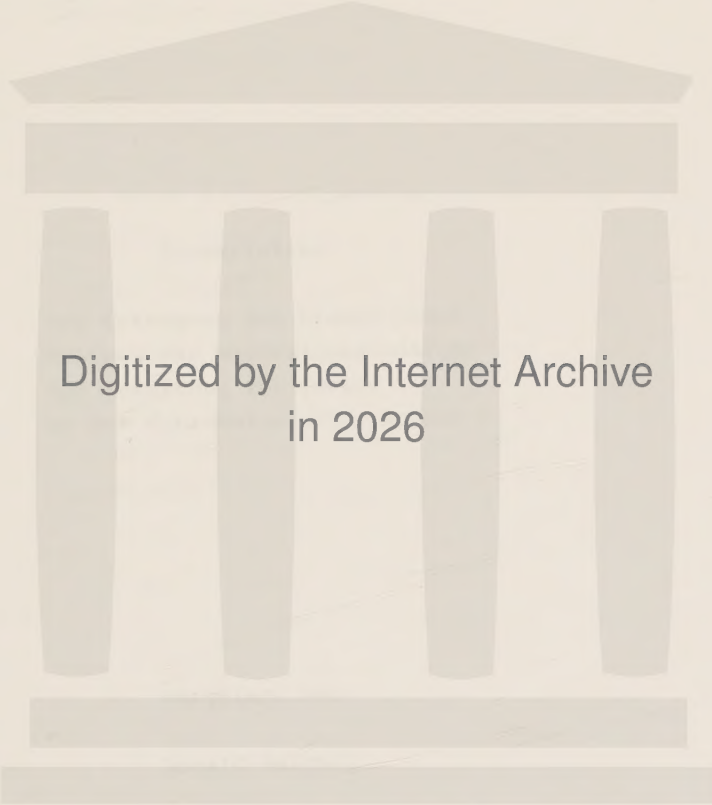
UNTERSUCHUNGEN ZUR
RNA-POLYMERASE I-KATALYSIERTEN BIOSYNTHESE
NIEDERMOLEKULARER KERN-RNA

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
RONALD REICHEL

Bochum 1983





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546428_0020

Untersuchungen zur RNA-Polymerase I-katalysierten
Biosynthese niedermolekularer Kern-RNA

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Ronald Reichel

Bochum 1983

Die vorliegende Arbeit entstand
am Lehrstuhl für Biochemie der
der Ruhr-Universität Bochum
unter der Leitung von

Herrn PD Dr. B.J. Benecke.

Für seine Hilfe und großzügige
Betreuung möchte ich an dieser
Stelle danken.

Herrn Prof. Dr. O. Pongs danke
ich für sein großes Interesse
und für die Unterstützung bei
der Anfertigung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis:

1.	<u>Einleitung</u>	1
2.	<u>Experimenteller Teil</u>	5
2.1.	Zellkultur	5
2.1.1.	HeLa S ₃ -Zellen	5
2.1.2.	3T6-Zellen	5
2.2.	Isolierung und Analyse von RNA	5
2.2.1.	Präparation von Zellkernen	5
2.2.2.	DNase-Verdauung	6
2.2.3.	Präparation von Nukleoli und nukleolarer RNA	7
2.2.4.	Gewinnung von RNA aus Ribosomen	7
2.2.5.	Phenolextraktion	8
2.2.6.	Affinitätschromatographie	8
2.2.7.	Sucrosegradienten-Zentrifugation	9
2.2.8.	Gelelektrophorese	9
2.2.8.1.	SDS-Polyacrylamidgele	9
2.2.8.2.	Harnstoffgele	10
2.2.9.	Autoradiographie	11
2.2.10.	Elution radioaktiver RNAs aus SDS-Polyacrylamidgelen	11
2.2.11.	"Fingerprints"	12
2.3.	<u>In vivo</u> und <u>in vitro</u> Synthese von RNA in Gegenwart von radioaktiven Isotopen	12
2.3.1.	<u>In vivo</u> Markierung	12
2.3.2.	<u>In vitro</u> RNA-Synthese mit isolierten Zellkernen	13
2.3.3.	<u>In vitro</u> Transkription isolierter Gensequenzen mit löslichen Extrakten	14
2.3.3.1.	Präparation eines zytoplasmatischen Extrakts	14
2.3.3.2.	Präparation eines Zellextrakts aus ganzen Zellen	14
2.3.3.3.	<u>In vitro</u> Transkription	15
2.3.4.	Actinomycin D-Behandlung	16

2.4.	Isolierung eines Klons aus einer Genbibliothek	16
2.4.1.	Plaque-Hybridisierung	16
2.4.2.	Hybridisierung der Phagen-Filter	18
2.4.3.	Ausstechen der Plaques	18
2.4.4.	Präparation von Phagen-DNA	19
2.4.4.1.	Herstellung eines primären Lysats	19
2.4.4.2.	Isolierung von Bakteriophagen und Reinigung der DNA	19
2.5.	Subklonierung	21
2.5.1.	Phosphatase-Behandlung	21
2.5.2.	Ligation	22
2.5.3.	Transformation	22
2.5.4.	Isolierung von Plasmid-DNA	23
2.6.	Restriktionsanalyse	25
2.6.1.	Verdauung mit Restriktionsenzymen	25
2.6.2.	DNA-Elektrophorese	25
2.6.3.	Rückgewinnung von DNA aus Agarosegelen	25
2.6.4.	"Southern-Blot"	26
2.7.	Filterhybridisierung	27
2.7.1.	Beladen der Filter	27
2.7.2.	Hybridisierung	27
2.7.3.	RNase T ₁ -Behandlung	28
2.7.4.	Elution von RNA aus Hybriden	28
2.8.	Strangtrennung	29
3.	<u>Ergebnisse</u>	30
3.1.	"Fingerprint"-Analysen von niedermolekularen Kern-RNAs	30
3.2.	Lokalisation der Maus snPI RNA-Gene	34

3.3.	Isolierung eines ribosomalen Klons aus einer menschlichen Genbibliothek	43
3.3.1.	Identifizierung von 18S rRNA-Klonen	43
3.3.2.	Identifizierung von snPI RNA-Klonen	44
3.4.	Charakterisierung des snPI RNA-Klons Δ HR,a	45
3.5.	Konstruktion von Subklonen	48
3.6.	Einfluß von RNase T ₁ auf RNA-DNA-Hybride	51
3.7.	Kartierung von HeLa snPI RNA-Molekülen	51
3.8.	Bestimmung des codogenen DNA-Strangs	58
3.9.	5'-Ende der HeLa snPI RNA Nr.1	60
3.10.	<u>In vitro</u> Transkription mit isolierten, klonierten Genen	64
3.10.1.	<u>In vitro</u> RNA-Synthese mit rDNA-haltigen Plasmiden	64
3.10.2.	Transkription von isolierten ribosomalen Fragmenten mit einem Manley-Extrakt	70
3.11.	<u>In vivo</u> Synthese von HeLa snPI RNAs	72
4.	<u>Diskussion</u>	75
5.	<u>Zusammenfassung</u>	82
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	84

Abkürzungen (Alle übrigen Abkürzungen sind im Text erklärt):

ATP	- Adenosintriphosphat
Bis	- N,N'-Methylenbisacrylamid
bp	- Basenpaare
BSA	- Rinderserumalbumin
cpm	- Zählereignisse pro Minute
CTP	- Cytidintriphosphat
DNA	- Desoxyribonukleinsäure
DNase	- Desoxyribonuklease
DTT	- Dithiothreitol
EDTA	- Ethylendiamintetraessigsäure, Natriumsalz
ETS	- Externer transkribierter "spacer"
g	- Erdbeschleunigung ($9.81 \text{ m} \times \text{s}^{-2}$)
GTP	- Guanosintriphosphat
HEPES	- N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
hnRNA	- "heterogenous nuclear" RNA
kb	- Kilobasen
mRNA	- "messenger" RNA
nt	- Nukleotide
NTS	- Nicht transkribierter "spacer"
OD	- Optische Dichte
oligo(dT)	- Oligodesoxythymidylsäure
pfu	- Phageneinheiten (plaque forming units)
poly(A)	- Polyadenylsäure
PVP	- Polyvinylpyrrolidon
rDNA	- ribosomale DNA
RNA	- Ribonukleinsäure
RNase	- Ribonuklease
rpm	- Umdrehungen pro Minute
rRNA	- ribosomale RNA
S	- Sedimentationskoeffizient
scrNA	- "small cytoplasmic" RNA
SDS	- Natriumdodecylsulfat
snPI RNA	- "small nuclear polymerase I" RNA
snRNA	- "small nuclear" RNA
TEMED	- N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	- transfer RNA
UTP	- Uridintriphosphat

Herkunft der verwendeten Enzyme und Chemikalien:

Acrylamid	- Serva (Heidelberg)
Actinomycin D	- Calbiochem (Giessen)
Agar-Agar	- Serva (Heidelberg)
Agarose	- BRL (Neu-Isenberg)
Alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1)	- Sigma (München)
α -Amanitin	- Boehringer (Mannheim)
Ammoniumpersulfat	- Serva (Heidelberg)
Ampicillin	- Serva (Heidelberg)
ATP	- Sigma (München)
Bacto-Agar	- Difco (Detroit)
Bacto-Trypton	- Difco (Detroit)
Bis	- Serva (Heidelberg)
BSA	- Sigma (München)
Casaminosäuren	- Difco (Detroit)
CTP	- Sigma (München)
Diaminopimelinsäure	- Sigma (München)
T ₄ DNA-Ligase (E.C. 6.5.1.1)	- BRL (Neu-Isenberg)
DNase I (E.C. 3.1.21.1)	- Boehringer (Mannheim)
DTT	- Serva (Heidelberg)
Ethidiumbromid	- Boehringer (Mannheim)
Exonuklease III (E.C. 3.1.11.2)	- BRL (Neu-Isenberg)
GTP	- Sigma (München)
Hefeextrakt	- Difco (Detroit)
HEPES	- Serva (Heidelberg)
8-Hydroxychinolin	- Serva (Heidelberg)
IPTG	- Sigma (München)
Kreatinphosphat	- Sigma (München)
Lysozym (E.C. 3.2.1.17)	- Serva (Heidelberg)
Natriumdesoxycholat	- Sigma (München)
NP 40	- BDH (Poole)
oligo(dT)-Zellulose	- BRL (Neu-Isenberg)
³² P-Orthophosphat (285 Ci/mg P)	- Amersham Buchler (Braunschweig)



PEG 6000	- Serva (Heidelberg)
Proteinase K (E.C. 3.4.21.14)	- Merck (Darmstadt)
PVP	- Sigma (München)
Restriktionsenzyme	- BRL (Neu-Isenberg)
RNase T ₁ (E.C. 3.1.27.3)	- Sigma (München)
Soja-Pepton	- Oxoid (England)
Sucrose	- BRL (Neu-Isenberg)
TEMED	- Bio-Rad (München)
Thymidin	- Sigma (München)
Tween 40	- Sigma (München)
5,6- ³ H-Uridin (40-60 Ci/mMol)	- Amersham Buchler (Braunschweig)
UTP	- Sigma (München)
5,6- ³ H-UTP (40-60 Ci/mMol)	- Amersham Buchler (Braunschweig)
α - ³² P-UTP (2000-3000 Ci/mMol)	- Amersham Buchler (Braunschweig)
Xgal	- Sigma (München)
Xylencyanol FF	- Merck (Darmstadt)

Alle übrigen Chemikalien wurden p.a. von den Firmen Merck oder Baker bezogen.

1. Einleitung:

Der Nachweis, daß DNA der Träger der genetischen Information ist, und die Aufklärung der DNA-Struktur durch Watson und Crick (1) waren zwei Entdeckungen, die wesentlich zu der Erkenntnis beitrugen, daß DNA zwei verschiedene Hauptfunktionen hat; und führten damit zu einem entscheidenden Auftrieb in der Entwicklung der modernen Biochemie.

Die erste Funktion der DNA ist ihre Selbstreplikation. Ein DNA-Molekül dient als Matrize für die Synthese von zwei identischen Tochtermolekülen und sichert damit die Erhaltung der genetischen Information in den Folgegenerationen.

Die zweite Hauptfunktion ist die Expression der genetischen Information in Form von Proteinen. Danach wird DNA in RNA umgeschrieben (transkribiert), und diese RNA wird anschließend in die Aminosäuresprache der Proteine übersetzt (translatiert).

Nach dem "Zentralen Dogma" der Molekularbiologie - von Crick bereits 1958 formuliert (2) - wird die genetische Information der DNA ausschließlich auf dem Weg über die RNA auf Proteine übertragen und niemals in der umgekehrten Richtung.

Die Genexpression in eukaryotischen, d.h. kernhaltigen, Zellen wird auf mehreren Ebenen kontrolliert; auf der Ebene der RNA-Synthese sind die meisten Kontrollmechanismen wirksam (3). Der Transkriptionsschritt ist somit beim Studium der Genregulation von besonderer Bedeutung.

Eine Untersuchung der Transkription in eukaryotischen Zellen erwies sich zunächst als äußerst schwierig, da es nicht möglich war, spezifische DNA-Fragmente, die für bestimmte RNA-Moleküle codieren, aus dem riesigen Eukaryontengenom zu isolieren. Erst durch die Einführung einer neuen Technik - der Klonierung von DNA-, die es erlaubte, einzelne Gene zu isolieren, wurde die Analyse der Transkription in eukaryotischen Zellen auf molekularer Ebene möglich (4).

Die Synthese von RNA-Molekülen wird durch das Enzym DNA-abhängige RNA-Polymerase katalysiert. Im Gegensatz zu bakteriellen Systemen enthalten eukaryotische Zellen drei RNA-Polymerasen, die für die Transkription verschiedener RNA-Klassen verantwortlich sind:

Der weitaus größte Teil eukaryotischer RNA wird im Nukleolus in Form einer ribosomalen Vorläufer-RNA synthetisiert, die in Säugetierzellen 45S rRNA genannt wird. Die Gene für dieses RNA-Polymerase I-Produkt liegen im Genom hintereinander und sind durch sogenannte nicht transkribierte "spacer" getrennt. Die 45S rRNA enthält die Sequenzen für die 28S rRNA, 18S rRNA und 5.8S rRNA, ferner noch weitere Abschnitte, die als transkribierte "spacer" bezeichnet werden. Die Reifung der 45S rRNA (5) führt zur Freisetzung der drei ribosomalen RNA-Moleküle, während die transkribierten "spacer" abgebaut werden. Die reifen ribosomalen RNAs wandern schließlich in Form der ribosomalen Untereinheiten ins Zytoplasma.

Die zweite Klasse hochmolekularer RNA wird als heterogene Kern-RNA ("heterogenous nuclear" RNA; hnRNA) bezeichnet und von RNA-Polymerase II transkribiert. Diese RNA-Spezies (Größe: 2-20 kb) sind die Vorläufer der wesentlich kleineren Boten-RNA ("messenger" RNA, mRNA). Die folgenden Schritte sind an der Bildung der mRNA beteiligt (3):

Bereits kurz nach dem Transkriptionsstart wird an das 5'-Ende der naszierenden hnRNA-Kette ein 7-Methylguanosin über eine 5'-5'-Triphosphatbrücke angehängt. Dieser Vorgang wird als Kappenbildung ("capping") bezeichnet. Anschließend werden an das 3'-Ende der hnRNA-Kette enzymatisch 100-200 AMP-Reste angehängt (Polyadenylierung). Diese Modifikation wird von einem Enzymsystem eingeführt, das unabhängig von der RNA-Polymerase wirkt. Durch das Herausschneiden von sogenannten intervenierenden Sequenzen (Introns) wird die hnRNA auf die Größe der mRNA reduziert, ein Prozeß, der als "splicing" bezeichnet wird. Schließlich verläßt die fertige mRNA den Zellkern und wandert ins Zytoplasma.

RNA-Polymerase III ist für die Synthese von 5S rRNA und transfer RNA (tRNA) verantwortlich. 5S rRNA gehört zu den ribosomalen RNAs und ist in der großen ribosomalen Unter-einheit lokalisiert. tRNA, die eine ausgeprägte Sekundär-
struktur aufweist, spielt eine wichtige Rolle bei der Translation.

Neben der tRNA und den beiden kleinen ribosomalen RNAs (5.8S rRNA und 5S rRNA) existieren in eukaryotischen Zellen noch eine ganze Reihe niedermolekularer RNA-Spezies, die sich in drei Gruppen zusammenfassen lassen:

Die am besten untersuchte Gruppe ist die der snRNAs ("small nuclear" RNAs) (6-8). Ihre Mitglieder (U_1 , U_2 , U_3 , U_4 , U_5 , und U_6) sind im Zellkern lokalisiert. Untersuchungen zur Synthese der snRNAs deuteten zunächst darauf hin, daß möglicherweise RNA-Polymerase I diese niedermolekularen RNAs transkribiert (9). Neuere Arbeiten lassen es jedoch als wahrscheinlich gelten, daß RNA-Polymerase II für die Synthese der U-RNAs verantwortlich ist (10, 11). Sequenz-analysen haben gezeigt, daß die snRNA-Sequenzen während der Evolution nur in einem relativ geringen Ausmaß ver-ändert wurden. Dies deutet auf eine wichtige biologische Funktion dieser Ribonukleinsäuren hin. Eine mutmaßliche Beteiligung der snRNAs am "splicing"-Prozeß (12-14) konnte bisher allerdings nicht bewiesen werden.

Im Gegensatz zu den snRNAs findet man die scRNAs ("small cytoplasmic" RNAs) im Zytoplasma (7). Die beiden Mit-glieder dieser RNA-Klasse (scL und scK) werden von RNA-Polymerase III transkribiert (9, 15). Durch Sequenzana-lysen wurde gezeigt, daß Teile der scL RNA Homologien zu einer Klasse repetitiver DNA-Sequenzen - der sogenann-ten Alu-Familie - aufweisen (16). Ein erster Anhaltspunkt bezüglich der Funktion von scL ist der experimentelle Befund von Walter und Blobel (17), wonach scL Bestand-teil des Signalerkennungspartikels ist, dem eine wesent-liche Funktion bei der Translokation von Proteinen durch die Membran des endoplasmatischen Reticulums zugeschrieben wird.

Die snPI RNAs ("small nuclear polymerase I" RNAs) repräsentieren die dritte Klasse niedermolekularer RNA-Moleküle. Die Abkürzung snPI bezieht sich auf ihre Lokalisation (im Zellkern) und die RNA-Polymerase, die für ihre Synthese zuständig ist (I). SnPI RNA-Moleküle wurden ursprünglich bei in vitro Transkriptionsstudien in isolierten HeLa-Zellkernen entdeckt (18). In HeLa-Zellen besteht die snPI RNA-Population aus ca. 20 Spezies, deren Größen sich im Bereich von 200-500 Nukleotiden bewegen. Im Gegensatz zum Hauptprodukt der durch RNA-Polymerase I katalysierten RNA-Synthese - nämlich der 45S rRNA - wird die Produktion von snPI RNAs nicht durch niedrige Konzentrationen von Actinomycin D (0.040 µg/ml) beeinflusst. Untersuchungen zur Bestimmung des Syntheseortes ließen vermuten, daß die snPI RNAs möglicherweise im Nukleoplasma transkribiert werden (18). Darüber hinaus kommen snPI RNA-Moleküle in allen bisher untersuchten Säugetierzelllinien vor (19). Sie sind in hohem Maße artspezifisch, d.h., sie zeigen in Zellen aus unterschiedlichen Spezies auch unterschiedliche snPI RNA-Spektren, hingegen ähnliche snPI RNA-Muster für verschiedene Zelltypen innerhalb einer Spezies. Über die biologische Funktion der snPI RNAs ist bisher nichts bekannt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Genstruktur und der Synthese der snPI RNA-Moleküle.

Es wurde untersucht, ob eine mögliche Beziehung zwischen den snRNAs und den snPI RNAs besteht, die beide zu den niedermolekularen Kern-RNAs zählen.

Weiterhin sollten die für snPI RNA codierenden DNA-Sequenzen innerhalb des Genoms lokalisiert werden.

Außerdem wurden die in vitro Transkription mit isolierten Genen und die in vivo Synthese der snPI RNAs studiert.

2. Experimenteller Teil:

2.1. Zellkultur:

2.1.1. HeLa S₃-Zellen:

HeLa-Zellen stammen aus einem menschlichen Zervixkarzinomgewebe und sind ihrer Morphologie nach Epithelzellen. Puck et al. isolierten 1955 den besonders widerstandsfähigen Subklon S₃ (20). Die Zellen wurden als Suspensionskultur in Jokliks MEM-Medium (Gibco), das 5% Kälberserum aus neugeborenen Kälbern enthielt, bei 37°C kultiviert (Zell-dichte: $4-5 \times 10^5$ Zellen/ml).

2.1.2. 3T6-Zellen:

Diese Zellen wurden 1963 von Todaro und Green (21) aus Mausembryonen gewonnen und als Zelllinie etabliert. Die 3T6-Fibroblasten wuchsen in Gewebekulturschalen als einschichtige Zellrasen ("monolayer") in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (Gibco), dem 10% fetales Kälberserum zugesetzt waren.

2.2. Isolierung und Analyse von RNA:

2.2.1. Präparation von Zellkernen:

Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Die Zellen der Suspensionskultur wurden in einem GSA-Rotor abzentrifugiert (170xg, 5 Minuten) und das Zellsediment mit isotonem Earles-Puffer (22) gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (170xg, 5 Minuten, Tischzentrifuge) wurden die Zellen in hypotonem Lysispuffer (1.6 mM MgCl₂; 6 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) suspendiert und zum Anschwellen 1 Minute stengelassen. Nach dem Zusatz von 1/20 Volumen einer 10%igen Lösung des nicht ionischen Detergens Nonident P 40 (NP 40) wurde die Zellsuspension zweimal für 30 Sekunden kräftig auf einem Vortex-Mixer geschüttelt. Die Vollständigkeit der Lysis ließ sich mit

Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops überprüfen. Die Zellkerne wurden abzentrifugiert (430xg, 5 Minuten, Tischzentrifuge) und zur DNase-Verdauung in HSB-Puffer (500 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) aufgenommen. Der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes entspricht dem Zytoplasma; es diente unter anderem bei der Ribosomenpräparation (2.2.4.). Eine Phenolextraktion (2.2.5.) entfernte die Proteine aus der zytoplasmatischen RNA.

Für die Kernpräparation aus 3T6-Zellen war die oben beschriebene Methode zu modifizieren, da diese Zellen nur als "monolayer"-Kulturen wachsen und fest auf der Oberfläche der Gewebekulturplatten verankert sind. Aus diesen Gründen wurden die Maus-Zellen auf den Kulturplatten lysiert:

Von den Gewebekulturplatten wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen zunächst mit isotonem Earles-Puffer, dann mit Lysispuffer gewaschen. Anschließend wurde Lysispuffer, der 0.5% NP 40 enthielt, auf die Kulturschalen gegeben. Nach einer kurzen Inkubationszeit (1-2 Minuten) konnten die lysierten Zellen mit einem Gummischaber von den Kulturplatten entfernt werden.

2.2.2. DNase-Verdauung:

Nach dem Zusatz von HSB-Puffer wurde die Zellkernsuspension kräftig geschüttelt (Vortex-Mixer), bis ein deutliches Chromatingel auftrat, das anschließend für 2 Minuten bei 37°C mit 50 µg/ml DNase I (RNase-frei, 23) zu inkubieren war. Nach Fällung des RNA-Protein-Gemisches mit 2.5 Volumina Ethanol (2 Stunden bei - 20°C) wurde das gefällte Material abzentrifugiert (16000xg, 15 Minuten, 4°C, HB 4-Rotor) und in SDS-Puffer (0.5% SDS; 1mM EDTA; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) gelöst. Eine nachfolgende Phenolextraktion lieferte saubere Kern-RNA.

2.2.3. Präparation von Nukleoli und nukleolarer RNA:

Nukleoli ließen sich mit einer zusätzlichen Zentrifugation (16000xg, 10 Minuten, 4°C, HB 4-Rotor) des Kernlysates nach der DNase-Verdauung als Sediment anreichern. Auch sie wurden in SDS-Puffer aufgenommen und mit Phenol extrahiert. Die nukleolare RNA ließ sich auf SDS-Sucrosegradienten (10-40%) auftrennen (Zentrifugationsbedingungen: 78000xg, 17 Stunden, 25°C, SW 40-Rotor). Für die Isolierung einzelner nukleolarer RNA-Spezies wurden die entsprechenden Gradientenfraktionen vereinigt und die RNA durch die Zugabe von Ethanol ausgefällt.

2.2.4. Gewinnung von RNA aus Ribosomen:

Hierfür wurden intakte Zellkerne in Lysispuffer aufgenommen, mit 1/10 Volumen einer 10%igen "Magic"-Lösung (2 Teile 10%iges Tween 40 und 1 Teil 10%iges Natriumdesoxycholat) versetzt und zweimal 30 Sekunden kräftig auf einem Vortex-Mixer geschüttelt. Anschließend wurden die Zellkerne abzentrifugiert (430xg, 5 Minuten, 4°C, Tischzentrifuge) und der Überstand, der das zytoplasmatische Skelett enthält, mit der Zytoplasmafraktion (siehe 2.2.1.) vereinigt. Aus dieser Lösung waren Zelltrümmer und Organellen durch eine Zentrifugation (16000xg, 15 Minuten, 4°C, HB 4-Rotor) zu entfernen. Der Zentrifugationsüberstand wurde mit RSB-Puffer (10 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) verdünnt und die Polysomen sedimentiert (103000xg, 2 Stunden, 4°C, SW 27-Rotor). Das Sediment ließ sich in RSB⁺-Puffer (10 mM NaCl; 5mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) aufnehmen, die ribosomalen Untereinheiten waren durch eine Zentrifugation (87000xg, 15 Stunden, 4°C, SW 27-Rotor) abzutrennen. Die den 40S- und 60S-Untereinheiten entsprechenden Fraktionen wurden zusammenpipettiert und die ribosomalen Proteine durch Phenolextraktion abgetrennt. Die zurückgebliebenen Ribonukleinsäuren wurden auf SDS-Sucrosegradienten (10-40%) aufgetragen und ultrazentrifugiert (139000xg, 14 Stunden, 25°C, SW 40-Rotor). Die Gradientenbereiche, in denen

18S rRNA und 28S rRNA lagen, wurden gesammelt und die ribosomalen RNAs durch Zugabe von Ethanol ausgefällt.

2.2.5. Phenolextraktion:

Den ersten Schritt der Phenolextraktion bildete eine Proteinase K-Verdauung. Zu dem in SDS-Puffer vorliegenden RNA-Protein-Gemisch wurde Proteinase K (250 µg/ml) hinzugefügt und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extraktion erfolgte nach der Methode von Penman (24):

Die wäßrige Lösung wurde mit je einem Volumen "Phenol" (500 ml Phenol, 70 ml m-Kresol, 225 ml H₂O, 0.5 g 8-Hydroxychinolin) und "Chloroform" (Chloroform mit 1% Isoamylalkohol) versetzt. Danach war die Lösung bis zur Ausbildung einer Emulsion kräftig zu mischen. Nach Phasentrennung (fünfminütige Zentrifugation bei 1500xg in einer Tischzentrifuge) wurde die organische Phase abgenommen und verworfen. Die wäßrige Phase wurde erneut mit einem gleichen Volumen "Chloroform" unterschichtet, kräftig geschüttelt und zentrifugiert. Diese beiden Extraktionsschritte wiederholten sich noch einmal, ihnen folgte eine zusätzliche "Chloroform"-Extraktion, um Phenolreste quantitativ zu entfernen. Die gereinigte RNA ließ sich durch eine Fällung mit Ethanol aus der wäßrigen Phase isolieren.

2.2.6. Affinitätschromatographie:

Zur Abtrennung von poly(A⁺)-mRNA aus zytoplasmatischer RNA wurden oligo(dT)-Zellulosesäulen benutzt. Diese Trennmethode beruht darauf, daß die poly(A)-Enden der mRNA unter geeigneten Bedingungen (500 mM Salz, Raumtemperatur) an die oligo(dT)-Ketten der Säule binden, während nicht adenylierte RNA (poly(A⁻)-RNA) die Säule passiert. Die aus dem Zytoplasma isolierte RNA wurde in Bindungspuffer (500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0.5% SDS; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) gelöst und auf die oligo(dT)-Säule aufge-

tragen (Als Säule diente eine Pasteurpipette (0.5 x 10 cm), die zu einem Drittel mit oligo(dT)-Zellulose gefüllt war. Die Säule war vor dem Auftragen der RNA mit Bindungspuffer zu äquilibrieren). Der Durchfluß wurde gesammelt und noch zweimal über die Säule gegeben. Die im Durchfluß befindliche poly(A⁻)-RNA ließ sich durch Zugabe von Ethanol ausfällen. Die poly(A⁺)-RNA verblieb auf der Säule, da die AT-Hybride nicht durch den Bindungspuffer getrennt wurden.

2.2.7. Sucrosegradienten-Zentrifugation:

Hochmolekulare RNA und ribosomale Untereinheiten konnten mit Hilfe von linearen Sucrosegradienten aufgetrennt werden.

Mit einer Gradientenmischkammer wurden entweder 15-30%ige RSB⁺-Sucrosegradienten (verwendete Lösungen: 15% Sucrose in RSB⁺ und 30% Sucrose in RSB⁺) oder 10-40%ige SDS-Sucrosegradienten (benutzte Lösungen: 10% Sucrose in SDS-Puffer und 40% Sucrose in SDS-Puffer) hergestellt. Die Gradienten wurden mit den jeweiligen Probelösungen überschichtet, über Nacht ultrazentrifugiert und anschließend fraktioniert. Handelte es sich bei den aufgetragenen Proben um radioaktiv markiertes Material, so wurde die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen in einem Szintillationszähler bestimmt. Aus den erhaltenen Werten ließ sich ein Radioaktivitätsprofil erstellen. Bei unmarkierten Proben wurden die Gradienten über eine Durchflußküvette ausgepumpt und die Absorption der einzelnen Fraktionen durch eine spektrometrische Messung im ultravioletten Bereich (260 nm) bestimmt. Ein angeschlossener Schreiber lieferte direkt das OD₂₆₀-Profil der aufgetrennten Proben.

2.2.8. Gelelektrophorese:

2.2.8.1. SDS-Polyacrylamidgele:

Zur Analyse niedermolekularer RNA-Moleküle ließen sich Polyacrylamidgele verwenden.

Im Falle von SDS-Polyacrylamidgelen wurde mit Hilfe einer Gradientenmischkammer zunächst ein lineares Gradientengel (4-10% oder 6-15%) zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstand von 1.3 mm gegossen (Gelvolumen: 26 ml). Auf das polymerisierte Gel (Trenngel) wurde anschließend ein 2.5%iges Sammelgel gegossen. Das fertige Gel war in eine Elektrophoreseapparatur einzusetzen, dessen Kammern den folgenden Laufpuffer enthielten: 2.88% Glycin, 0.72% Tris, 0.1% SDS, pH 8.5. Die phenolextrahierte RNA wurde in 50 µl RNA-Probenpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8; 1% SDS; 10% Glycerin; 0.1% Bromphenolblau) gelöst und auf das Gel aufgetragen. Es wurde bei konstanter Stromspannung für 600 V x Stunden, meist 15 Stunden bei 40 V, elektrophoriert.

Verwendete Lösungen:

Acrylamid- konzentrationen:	4%	6%	10%	15%	2.5%
H ₂ O	10.5 ml	9.5 ml	6.6 ml	4.1 ml	7.8 ml
1.5 M Tris- HCl, pH 8.8	1.9 ml	1.9 ml	1.9 ml	1.9 ml	1.2 ml ⁺
50% Glycerin	0.3 ml	0.3 ml	1.25 ml	1.25 ml	-
10% SDS	0.15 ml	0.15 ml	0.15 ml	0.15 ml	0.1 ml
30% Acrylamid/ 0.8% Bis	2 ml	3 ml	5 ml	7.5 ml	0.8 ml
5% TEMED	81 µl	81 µl	81 µl	81 µl	50 µl
10% Ammonium- persulfat	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	250 µl

⁺ 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

2.2.8.2. Harnstoffgele:

RNA-Elektrophoresen unter denaturierenden Bedingungen wurden mit 8%igen Polyacrylamidgelen in Gegenwart von 7 M Harnstoff ausgeführt (verwendete Gellösung: 8% Acrylamid/ 0.21% Bis; 1 x TEB, pH 8.3; 7 M Harnstoff; 0.06% Ammoniumpersulfat; 0.06% TEMED. 1 x TEB ist: 1.08% Tris; 0.55%

Borsäure; 20 mM EDTA; pH 8.3). Die gereinigte RNA-Probe wurde in TE/SDS (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA; 0.5% SDS) aufgenommen und mit einem gleichen Volumen RNA-Probenpuffer (80% Formamid, entionisiert; 50 mM Tris-HCl, pH 7.9; 1 mM EDTA; 0.1% Bromphenolblau; 0.1% Xylencyanol FF) versetzt. Nach 2 Minuten bei 90°C wurde die denaturierte RNA direkt auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 30 mA. Nachdem die Xylencyanolfront ca. 4/5 des Gels durchwandert hatte, war die Elektrophorese abgeschlossen.

2.2.9. Autoradiographie:

Das Spektrum der radioaktiv markierten RNA-Spezies in den Polyacrylamidgelen wurde durch eine Autoradiographie bestimmt.

Zu diesem Zweck wurde auf die getrockneten Gele ein Röntgenfilm (Fuji RX) aufgelegt und in einer Kassette mit einer Cronex-Verstärkerfolie (Du Pont) bei - 70°C belichtet. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers. Entsprechend ließ sich die Verteilung der radioaktiven Proben auf getrockneten Nitrozellulosefiltern oder "Southern-Blots" sichtbar machen.

2.2.10. Elution radioaktiver RNAs aus SDS-Polyacrylamidgelen:

Für die Elution radioaktiv markierter RNA wurden die Gele nicht getrocknet, sondern in eine Plastikfolie eingewickelt bei 4°C autoradiographiert. Die entsprechende RNA-Bande wurde mit einer Rasierklinge aus dem Gel ausgeschnitten und durch eine 5 ml-Spritze gepreßt. Die dadurch erhaltenen kleinen Gelbröckchen wurden in SDS-Puffer aufgenommen, über Nacht bei 37°C an einem Rührmotor inkubiert und anschließend abfiltriert. Nach Zugabe von tRNA (50 µg/ml) wurde das Filtrat mit 2.5 Volumina Ethanol versetzt. Nach mindestens 1 Stunde bei - 20°C ließ sich der RNA-Niederschlag abzentrifugieren (16000xg, 15 Minuten, 4°C, HB 4-Rotor) und in TE/SDS lösen.

2.2.11. "Fingerprints":

Für "Fingerprint"-Analysen wurden RNA-Moleküle mit Ribonuklease T_1 (Guanin-spezifische Endonuklease) gespalten. Die resultierenden Oligonukleotide (charakteristisch für jede RNA-Spezies) wurden zweidimensional durch Hochspannungselektrophorese (erste Dimension) und Homochromatographie (zweite Dimension) aufgetrennt. Die zweidimensionale Auftrennung der radioaktiv markierten Oligonukleotide lieferte durch eine anschließende Autoradiographie den "Fingerprint" der entsprechenden RNA.

Die für die RNase T_1 -Verdauung verwendeten RNA-Spezies wurden aus SDS-Polyacrylamidgelen eluiert (siehe 2.2.10). Die Spaltung der RNAs, die sich anschließende zweidimensionale Auftrennung der Oligoribonukleotide und die Autoradiographie wurden von Dr. Hans-Jürg Monstein (Uppsala) ausgeführt (25).

2.3. In vivo und in vitro Synthese von RNA in Gegenwart von radioaktiven Isotopen:

2.3.1. In vivo Markierung:

Zur in vivo Markierung von RNA mit ^{32}P -Orthophosphat wurde ein phosphatarmes Zellkulturmedium hergestellt, um aufgrund der hohen spezifischen Aktivität möglichst hohe Einbauraten von markierten Phosphatgruppen in Nukleinsäureketten zu erzielen. Dieses Medium unterschied sich vom Standardmedium in zwei Punkten: es enthielt nur 6 mg/l Phosphat und 50 mM HEPES, pH 7.2, als zusätzliche Puffersubstanz, da im normalen Medium Phosphatsalze die Pufferfunktion ausüben.

Für die RNA-Markierung wurden HeLa-Zellen abzentrifugiert (170xg, Raumtemperatur, 5 Minuten, GSA-Rotor), in einem gleichen Volumen phosphatarmen Mediums aufgenommen und bei 37°C mit 5-10 mCi ^{32}P -Orthophosphat/l inkubiert (Für die in vivo Experimente wurden zwischen 100 und 600 ml HeLa-Zellen verwendet).

3T6-Zellen wurden mit 500 μCi ^{32}P -Orthophosphat pro Platte markiert (Plattenvolumen: 9 ml). Dazu wurde das normale Medium vollständig von der Platte abgenommen und durch phosphatarmes Medium ersetzt.

Als zusätzliche Verbindung für die RNA-Markierung wurde ^3H -Uridin verwendet. Die zelluläre RNA ließ sich durch den Zusatz dieses Nukleosids (50 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) zum normalen Medium radioaktiv markieren.

2.3.2. In vitro RNA-Synthese mit isolierten Zellkernen:

Vereinfacht lassen sich die biochemischen Grundlagen der RNA-Synthese folgendermaßen zusammenfassen: in Gegenwart von bivalenten Metallkationen und der vier Ribonukleotide ATP, GTP, CTP und UTP synthetisiert das Enzym DNA-abhängige RNA-Polymerase RNA-Moleküle unter Verwendung einer DNA als Matrize.

Bei einer Transkription mit isolierten Zellkernen mußten diesen nur die Nukleotide und die Metallsalze zugesetzt werden, um die notwendigen Bedingungen für eine Transkription zu erfüllen, da die DNA und die RNA-Polymerase Bestandteile der Kerne sind.

Für eine Transkription mit isolierten DNA-Sequenzen wurden lösliche Zellextrakte verwendet, die unter anderem die RNA-Polymerase enthalten. Um eine RNA-Synthese zu ermöglichen, mußten neben der isolierten DNA und dem Extrakt zusätzlich die Nukleotide und die Metallsalze zugegen sein.

Isolierte Zellkerne (siehe 2.2.1.) wurden in Suspensionspuffer (1 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$; 1 mM DTT; 0.2 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 7.9; 25% Glycerin) resuspendiert und mit den angegebenen Mengen α -Amanitin für 10 Minuten bei 4°C präinkubiert. Das Reaktionsendvolumen betrug 280 μl und enthielt zusätzlich: 1 mM ATP; 1 mM GTP; 1 mM CTP; 2 μM UTP; 2 mM MnCl_2 ; 5 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$; 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 20 μCi α - ^{32}P -UTP (2000-3000 Ci/mMol) oder 20 μCi ^3H -UTP (40-60 Ci/mMol). Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei 25°C wurden die Zellkerne einer DNase-Verdauung (siehe 2.2.2.)

unterzogen und anschließend mit Phenol extrahiert. Die auf diese Art präparierten RNAs wurden entweder für Hybridisierungen eingesetzt oder durch Gelelektrophorese analysiert.

2.3.3. In vitro Transkription isolierter Gensequenzen mit löslichen Extrakten:

2.3.3.1. Präparation eines zytoplasmatischen Extrakts (26):

Die folgenden Schritte waren zwischen 0 und 4°C auszuführen: HeLa-Zellen wurden in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (170xg, 5 Minuten) und zweimal mit isotonem Puffer (120 mM NaCl; 30 mM HEPES-NaOH, pH 7.9; 1 mM DTT) gewaschen. Danach wurden die Zellen in hypotonem Puffer (10 mM HEPES-NaOH, pH 7.9; 10 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 0.1 mM EDTA; verwendetes Volumen: achtfaches Zellsedimentvolumen) resuspendiert, sedimentiert und in einem dreifachen Zellsedimentvolumen des gleichen Puffers aufgenommen. Nach einer fünfzehnminütigen Anschwellzeit ließen sich die Zellen in einem Dounce-Homogenisator lysieren (10-20 Stöße mit einem B-Pistill). Zum Lysat wurde 1/4 Volumen fünffach konzentrierter Extraktbuffer (200 mM HEPES-NaOH, pH 7.9; 17.5 mM MgCl₂; 50% Glycerin; 0.5 mM EDTA; 5 mM DTT; 750 mM KCl) zugesetzt und 1 Stunde zentrifugiert (102000xg, SW 65-Rotor). Der partikelfreie Überstand wurde in 0.2 ml-Portionen aufgeteilt und bei -70°C eingefroren.

2.3.3.2. Präparation eines Zellextrakts aus ganzen Zellen (27):

Die einzelnen Arbeitgänge wurden ebenfalls bei 0-4°C durchgeführt:

HeLa-Zellen wurden in Phosphatpuffer (130 mM NaCl; 2 mM KCl; 1.5 mM KH₂PO₄; 8 mM Na₂HPO₄; 0.5 mM MgCl₂; pH 7.4) gewaschen, abzentrifugiert und in hypotonem Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.9; 1 mM EDTA; 5 mM DTT; Puffervolumen: vierfaches Zellsedimentvolumen) resuspendiert. Nach 20 Minuten wurden die angeschwollenen Zellen mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators (B-Pistill) lysiert. Es wurde ein dem vierfachen Zell-

sediment entsprechendes Volumen an Sucrosepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.9; 10 mM $MgCl_2$; 2 mM DTT; 25% Sucrose; 50% Glycerin) hinzugefügt und langsam gerührt. Anschließend wurde ein Zellsedimentvolumen einer gesättigten $(NH_4)_2SO_4$ -Lösung tropfenweise zugesetzt und für weitere 30 Minuten gerührt. Der Extrakt wurde daraufhin für 3 Stunden zentrifugiert (250000xg, SW 65-Rotor). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und Proteine durch den Zusatz von festem $(NH_4)_2SO_4$ (0.33 g/ml Suspension) ausgefällt. Der Niederschlag ließ sich durch eine Zentrifugation sammeln (16000xg, 20 Minuten, HB 4-Rotor) und in Ammoniumsulfatpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.9; 6 mM $MgCl_2$; 40 mM $(NH_4)_2SO_4$; 0.2 mM EDTA; 1 mM DTT; 15% Glycerin; verwendetes Volumen: 1/10 Volumen des Überstandes der SW 65-Zentrifugation) aufnehmen. Nach einer fünfstündigen Dialyse der Suspension gegen Kaliumchloridpuffer (40 mM HEPES-NaOH, pH 7.9; 3.5 mM $MgCl_2$; 10% Glycerin; 0.1 mM EDTA; 1 mM DTT; 150 mM KCl) wurde das Dialysat kurz zentrifugiert (10500xg, 10 Minuten, HB 4-Rotor), um entstandene Präzipitate zu entfernen, der Überstand in kleinen Portionen zu je 0.2 ml in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und dann bei $-70^{\circ}C$ gelagert.

2.3.3.3. In vitro Transkription:

Die Reaktionsgemische für in vitro RNA-Synthesen mit Zellextrakten erbrachten ein Volumen von 50 μ l und setzten sich wie folgt zusammen: 23 mM HEPES-NaOH, pH 7.9; 6 mM $MgCl_2$; 10% Glycerin; 1 mM DTT; 0.1 mM EDTA; 100 mM KCl; 200 μ g/ml α -Amanitin; 0.66 mM ATP, GTP, CTP; 10 μ M UTP; 20 μ Ci α - ^{32}P -UTP (2000-3000 Ci/mMol); 10 mM Kreatinphosphat; 20 μ l Extrakt; 0.5-2 μ g DNA. Einige Ansätze enthielten zusätzlich 200 μ g/ml Actinomycin D (siehe Ergebnisteil). Nach einer sechzigminütigen Inkubation bei $30^{\circ}C$ wurde die Reaktion durch den Zusatz von SDS-Puffer gestoppt. Die Ansätze wurden phenolextrahiert und die erhaltene RNA durch Gelelektrophorese analysiert.

2.3.4. Actinomycin D-Behandlung:

Zur Hemmung der ribosomalen RNA-Synthese waren die Zellen mit Actinomycin D vorzubehandeln (28).

HeLa-Zellen wurden fünffach konzentriert und für 45 Minuten bei 37°C mit 0.040 µg/ml Actinomycin D inkubiert.

Die Inhibitorbehandlung mit 3T6-Zellen erfolgte in der Hälfte des normalen Plattenmediums (gleiche Inkubationsbedingungen wie oben).

2.4. Isolierung eines Klons aus einer Genbibliothek:

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genbank von Dr. T. Maniatis verwendet. Diese Bank ist im Detail beschrieben (29, 30). Ihre Herstellung soll hier noch einmal kurz schematisch umrissen werden:

Zur Konstruktion dieser Genbank wurde das gesamte Genom aus menschlicher, fetaler Leber in kleine Stücke mit der durchschnittlichen Länge von 20 kb zerlegt. Diese DNA-Stücke ließen sich mit einem speziellen λ-Phagenvektor (Charon 4A, 31) verbinden. Die so erzeugten rekombinierten DNA-Moleküle wurden durch in vitro Verpackung in komplette, infektiöse Phagenpartikel eingeschleust. Anschließend folgte eine Infektion von E.Coli Zellen mit diesen rekombinierten Phagen. Das resultierende Bakterienlysate enthält millionenfach amplifizierte Phagen, die alle ein menschliches DNA-Fragment als Passagier tragen. Das Lysat entspricht einer klonierten Bibliothek eukaryotischer DNA. Zur Isolierung eines λ-Klons wurden die folgenden Techniken angewendet.

2.4.1. Plaque-Hybridisierung (32):

Mit den folgenden Volumina können 7500 Plaques auf einer Platte mit einem Durchmesser von 14.5 cm getestet werden. Das ursprüngliche Phagenlysate (Titer: 3×10^9 Phageneinheiten (pfu)/ml) wurde mit sterilem Phagenpuffer (20 mM NaCl; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1% Glycerin;

0.05% Gelatine) verdünnt, so daß in 100 µl Volumen ca. 7500 Phagen (bzw. 7500 pfu) vorlagen. Diese verdünnte Phagensuspension wurde mit jeweils 100 µl einer sterilen Magnesium-Calcium-Lösung (10 mM $MgCl_2$, 10 mM $CaCl_2$) und 100 µl einer Übernachtskultur des E.Coli-Stammes DP50 supF (Kulturmedium: 0.5% NaCl, 0.5% Hefeextrakt, 1% Soja-Pepton, 10 mM $MgCl_2$, 0.2% Casamino-säuren, 0.004% Thymidin, 0.01% Diaminopimelinsäure) 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden 8 ml einer 42°C warmen Agarlösung (DP50 supF-Medium mit 0.7% Agar-Agar) zugesetzt, die Suspension kurz durchmischt und auf eine auf 37°C vorgewärmte Boden-Agar-Platte gegossen (Boden-Agar ist: DP50 supF-Medium mit 1.25% Bacto-Agar). Nach dem Erstarren des auf-gebrachten Agars folgte eine zwölfstündige Inkubation der Platte bei 37°C. Während dieser Inkubationszeit vermehren sich die Bakterien und führen zur Bildung eines Bakterien-rasens mit Löchern, die man als Plaques bezeichnet. Diese Löcher entstehen durch Phagenpartikel, die aus befallenen Bakterien nach deren Lysis freigesetzt werden. Die Plaques hatten einen Durchmesser von ungefähr 1.5 mm. Die Platte war zur Aushärtung des Top-Agars mindestens 1 Stunde auf 4°C abzukühlen. Dieser Schritt war notwendig, damit bei der nachfolgenden Übertragung von Plaques auf Nitrozellulose-filter keine Agarreste auf den Filtern haften blieben. Auf einem Nitrozellulosefilter (BA 85, Durchmesser 13.5 cm) wurden mit einem Kugelschreiber Markierungen angebracht und der Filter mit der unbeschrifteten Seite so auf die Agar-oberfläche gelegt, daß er in direkten Kontakt mit den Phagenkolonien kam (Die Filtermarkierungen waren auf die Platte zu übertragen). Nach 20-30 Minuten bei 4°C wurde der Filter mit einer Pinzette vorsichtig abgenommen und mit der Phagenseite nach oben auf mehrere Lagen Whatman 3 MM-Papier gelegt, das mit Denaturierungslösung (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) befeuchtet war. Nach 10 Minuten wurde der Filter auf einen neuen Stapel 3:MM-Papier umgesetzt, das mit Neutralisationspuffer (2xSSC; 0.2 M Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA; SSC ist: 0.15 M NaCl; 0.015 M Na-citrat, pH 7.0) getränkt war (Neutralisationsdauer: 10 Minuten). Daran

schloß sich eine Trocknung des Filters an der Luft an, gefolgt von einem zweistündigen Backen bei 80°C in einem Vakuumofen. Von jeder Platte waren zwei unterschiedlich markierte Filter abziehen, um später durch Vergleich der Duplikate unspezifische Signale von spezifischen zu unterscheiden.

2.4.2. Hybridisierung der Phagen-Filter:

Die gebackenen Filter wurden hintereinander in eine Glaschale gegeben, die eine so große Menge Vorhybridisierungslösung enthielt, daß alle Filter vollständig bedeckt waren. Die Vorhybridisierungslösung hatte folgende Zusammensetzung: 50% Formamid, entionisiert; 4xSET; 5xDenhardts-Reagenz; 0.1% SDS; 75 µg/ml denaturierte E.Coli-Nukleinsäuren; SET ist: 0.15 M NaCl; 1 mM EDTA; 30 mM Tris-HCl, pH 7.9; Denhardts Reagenz ist (33): 0.02% BSA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll 400). Nach einer Inkubationszeit von mindestens 4 Stunden bei 42°C wurden die Rundfilter in eine Schale mit Hybridisierungslösung umgesetzt. Die Hybridisierungslösung entspricht der Vorhybridisierungslösung, enthielt aber zusätzlich radioaktiv markierte RNA als Probe für die gesuchte DNA-Sequenz. Die Hybridisierung erstreckte sich bei 42°C oder 60°C über einen Zeitraum von 40-60 Stunden. Danach wurden die Nitrozellulosefilter unter leichtem Schütteln je zweimal für 45 Minuten in 4xSET + 0.1% SDS, 2xSET + 0.1% SDS und 0.5xSET + 0.1% SDS bei 42 °C gewaschen. Die Filter wurden an der Luft getrocknet und auf einem Karton befestigt, der einige radioaktive Markierungen trug. Die sich anschließende Autoradiographie erfolgte wie unter 2.2.9. beschrieben.

2.4.3. Aussteichen der Plaques:

Nicht alle auf dem Röntgenfilm erschienenen Signale waren spezifisch. Ein Teil der Signale wurde durch unspezifisch gebundene radioaktiv markierte RNA hervorgerufen, die sich auch durch mehrmaliges Waschen nicht entfernen ließ. Deshalb

mußten von jeder Platte zwei Filter abgezogen werden. Es wurden nur solche Plaques als positiv (spezifisch) registriert, die auf den beiden Filterduplikaten ein positives Signal ergeben hatten. Die positiven Plaques wurden mit einer Pasteurpipette aus beiden Agarschichten ausgestochen, in 1 ml Phagenpuffer suspendiert, der zum Abtöten der Bakterien 2 Tropfen Chloroform enthielt, und bei 4°C gelagert.

2.4.4. Präparation von Phagen-DNA:

2.4.4.1. Herstellung eines primären Lysats:

0.1 ml einer Bakterienkultur (DP50 supF, $OD_{578\text{ nm}} = 1$) wurden mit jeweils 0.1 ml steriler Magnesium-Calcium-Lösung und 0.1 ml einer Phagenverdünnung (ca. 5×10^5 pfu) vereinigt. Daran schloß sich eine fünfzehnminütige Inkubation der Suspension bei 37°C an, um eine Präadsorption der Phagen an die Bakterien zu erreichen. Anschließend wurden 3 ml DP50 supF-Medium zugesetzt und die Lösung in einem Reagenzglas über Nacht bei 37°C in einem Warmluftinkubator geschüttelt. Die nach der lytischen Infektion verbleibenden Bakterientrümmere wurden abzentrifugiert (10500xg, 10 Minuten, 4°C, HB 4-Rotor), der Überstand mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und bei 4°C aufbewahrt. Dieses primäre Lysat hatte einen Phagentiter von ungefähr 10^{10} pfu/ml.

2.4.4.2. Isolierung von Bakteriophagen und Reinigung der DNA:

Die folgenden vier Lösungen wurden vereinigt und 15 Minuten bei 37°C präinkubiert: 3.3 ml DP50 supF-Kultur ($OD_{578\text{ nm}} = 1$), 3.3 ml Magnesium-Calcium-Lösung, 3.3 ml Phagenpuffer und 0.050 ml des primären Lysats (Titer: 10^{10} pfu/ml). Nach Präadsorption wurden 250 ml vorgewärmtes DP50 supF-Medium und das Gemisch über Nacht bei 37°C unter Schütteln bei guter Durchlüftung in einem Erlenmeyerkolben inkubiert. Nach Zusatz von 2 ml Chloroform zu der lysierten Kultur schloß sich eine zusätzliche einstündige Inkubation im Schüttler an. Daraufhin wurden NaCl (60 g/l) und 1 M $MgCl_2$ (10 ml/l) hin-

zugefügt und die Lösung für 10 Minuten auf Eis gelassen. Die nachfolgende Zentrifugation (10000xg, 20 Minuten, 4°C, HB 4-Rotor) diente zur Entfernung der Bakterientrümmern. Im Überstand wurde festes Polyethylenglykol (PEG 6000, 100 g/l) gelöst und die Suspension 4 Stunden bei 4°C inkubiert. Die ausgefällten Phagenpartikel ließen sich durch eine Zentrifugation (10000xg, 30 Minuten, 4°C, GSA-Rotor) sammeln und in TM-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 10 mM MgCl_2) resuspendieren. Zu der Phagensuspension wurde ein gleiches Volumen an Chloroform hinzugesetzt und kurz (30 Sekunden) auf einem Vortex-Mixer gemischt. Die Trennung der beiden Phasen erfolgte durch eine Zentrifugation (1500xg, 5 Minuten, Raumtemperatur, Tischzentrifuge). Die wäßrige Phase, welche die Phagen enthielt, wurde abgenommen und mit festem CsCl versetzt (0.5 g/ml). Die Bakteriophagensuspension wurde auf einen CsCl-Stufengradienten aufgetragen, der aus drei Schichten mit den Dichten 1.7, 1.5 und $1.45 \text{ g} \times \text{cm}^{-3}$ bestand. Die Bakterienviren ließen sich durch eine dreistündige Zentrifugation bei 25°C in einem SW 40-Rotor anreichern (111000xg). Danach war eine weißliche Phagenbande an der Grenzphase zwischen den beiden Schichten der Dichte 1.45 und $1.5 \text{ g} \times \text{cm}^{-3}$ erkennbar. Diese Bande wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und mit einer CsCl-Lösung der Dichte $1.479 \text{ g} \times \text{cm}^{-3}$ verdünnt. Daraufhin folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (236000xg, 25°C, 7 Stunden, TV 865-Rotor), der zur weiteren Reinigung der Phagenpartikel diente. Die Bakteriophagenpartikel wurden in einen Dialyseschlauch umgefüllt, mit 1 mg/ml Proteinase K und 25 mM EDTA versetzt und für 2 Stunden gegen SDS-Puffer dialysiert. Hierdurch werden die Phagenköpfe gesprengt und die rekombinierte DNA freigesetzt. Nachdem das Dialysat (3 ml Volumen) vorsichtig in ein Spitzbodenglas überführt worden war, wurden jeweils 3 ml "Phenol" (siehe 2.2.5.) und 3 ml "Chloroform" (siehe 2.2.5.) zugegeben. Die Lösungen wurde durch vorsichtiges Schütteln vermischt. Die organische und die wäßrige Phase ließen sich durch eine fünfminütige Zentrifugation in einer Tischzentrifuge trennen (1500xg). Die Phenol-Chloroform-Phase wurde

verworfen. Nach Zusatz von 3 ml "Chloroform" wurde erneut vorsichtig geschüttelt, zentrifugiert und die organische Phase abgenommen. Die beiden Extraktionsgänge waren insgesamt dreimal durchzuführen. Alle Phenol-extraktionen zur Reinigung von DNA erfolgten analog zu dem beschriebenen Verfahren. Die wäßrige Phase wurde schließlich gegen TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA) dialysiert und die gereinigte Phagen-DNA bei 4°C gelagert.

2.5. Subklonierung:

Für das Subklonieren mit Plasmid-Vektoren wurde das Plasmid mit Restriktionsenzymen geöffnet und in vitro mit einem fremden DNA-Fragment verbunden. Das Ergebnis ist ein rekombiniertes DNA-Molekül. Ein großes Problem bei dieser Technik ist die Unterscheidung zwischen Plasmiden, die fremde DNA-Sequenzen enthalten, und solchen, die ohne Insertion rezirkularisiert wurden. Die Rezirkularisierung eines Plasmids kann durch eine Phosphatase-Behandlung stark limitiert werden (34).

2.5.1. Phosphatase-Behandlung:

Die Plasmid-DNA wurde mit den gewünschten Restriktionsenzymen geschnitten (siehe 2.6.1.), die Lösung anschließend phenolextrahiert und mit 2.5 Volumina Ethanol versetzt. Die abzentrifugierte DNA wurde in Phosphatase-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM $MgCl_2$) aufgenommen und mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) für 30 Minuten bei 65°C inkubiert (1 Einheit CIAP/1 µg DNA; DNA-Konzentration: 1 µg/10 µl). Nach dem erneuten Zusatz der gleichen Menge CIAP folgte eine weitere Verdauung für 30 Minuten. Die Lösung wurde mit TE-Puffer verdünnt und phenolextrahiert. Die wäßrige Phase wurde durch eine konzentrierte NaCl-Lösung auf 0.2 M NaCl angeglichen und die Nukleinsäure durch den Zusatz von Ethanol ausgefällt.

2.5.2. Ligation:

Das zu klonierende DNA-Fragment wurde aus einem größeren DNA-Stück mit geeigneten Restriktionsenzymen herausgeschnitten, in einem Agarosegel analysiert und durch eine elektrophoretische Elution isoliert (siehe 2.6.). Für die Ligasereaktion waren gleiche molare Mengen an phosphatasebehandeltem Plasmid und an dem zu klonierenden DNA-Fragment zu vereinigen. Zu dieser DNA-Lösung wurden 2.5 Volumina Ethanol zugesetzt. Nach 2 Stunden bei -20°C wurde die präzipitierte DNA abzentrifugiert (5 Minuten, Eppendorffzentrifuge, 4°C), das DNA-Sediment in Ligasepuffer (66 mM Tris-HCl, pH 7.4; 5 mM MgCl_2 ; 10 mM DTT; 1 mM ATP) aufgenommen und für 2 Minuten auf 37°C erwärmt. Nach Zusatz von T_4 DNA-Ligase (3 Einheiten/1 μg DNA) folgte eine sechzigminütige Inkubation der Lösung bei 22°C (DNA-Konzentration: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Durch Zugabe entsprechender Stammlösungen wurde der Ligaseansatz auf jeweils 10 mM MgCl_2 und 10 mM CaCl_2 gebracht und danach direkt für die Transformation eingesetzt.

2.5.3. Transformation:

Zur Vermehrung von rekombinierten Plasmiden wurden diese in Bakterien eingeschleust, in denen sie sich autonom replizieren. Durch die Kultivierung von solchen transformierten Bakterien ist es möglich, große Mengen an Plasmiden zu erhalten, die das eingebaute fremde DNA-Fragment besitzen.

Eine 10 ml Kultur des E.Coli-Stammes JM 103 wurde über Nacht bei 37°C in LB-Medium (1% Bacto-Trypton; 0.5% Hefeextrakt; 1% NaCl; pH 7.5) kultiviert. Die Übernachtskultur wurde 1:100 verdünnt und bis zum Erreichen einer Absorption von 0.7 (bei 578 nm gemessen) inkubiert. Von dieser Suspension wurden 2 ml abzentrifugiert (2 Minuten, Eppendorffzentrifuge, 4°C), das Zellsediment in 1 ml kalter CaCl_2 -Lösung (50 mM) suspendiert, mit 0.1 ml Ligationsansatz (siehe 2.5.2.) versetzt, durchmischt und 25 Minuten in Eis stehengelassen. Anschließend wurde der

Ansatz für 2 Minuten auf 37°C erwärmt, danach 10 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und nach Zusatz von 2 ml LB-Medium 30 Minuten bei 37°C geschüttelt. Kleine Fraktionen (0.1-0.8 ml) des Transformationsansatzes wurden daraufhin auf Xgal-Platten ausplattiert (100 ml LB-Medium wurde in Gegenwart von 1.25% Bacto-Agar autoklaviert. Die Lösung wurde auf 42°C abgekühlt, mit 7 mg Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG), 25 mg 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid (Xgal) und 5 mg Ampicillin versetzt und auf Kulturplatten ausgegossen). Nach einer 12-15stündigen Inkubation bei 37°C erschienen die ersten Kolonien.

Alle angewachsenen Bakterienkolonien enthalten Plasmide, da das verwendete Plasmid (pUC 8, 35) ein Resistenzgen für Ampicillin besitzt (JM 103 trägt kein Resistenzgen). Bei der Unterscheidung zwischen rezirkularisierten Plasmiden und solchen mit insertierten DNA-Sequenzen wurde die folgende Farbreaktion ausgenutzt: Bakterien des E.Coli-Stammes JM 103, die rezirkularisierte Plasmide ohne DNA-Einschub enthalten, produzieren aktive β -Galactosidase, die Xgal spaltet, dabei zur Bildung von Indigo führt und somit blau gefärbte Bakterienkolonien erzeugt. Durch Plasmide, die insertierte DNA-Fragmente tragen, wird die Expression des Enzyms verhindert, da die fremde DNA in das β -Galactosidase-Gen eingebaut wurde. Weiße Bakterienkolonien enthalten somit die gewünschten Plasmide mit fremden DNA-Einschüben.

2.5.4. Isolierung von Plasmid-DNA:

Zunächst wurden 5 ml LB-Medium, das 50 μ g/ml Ampicillin enthielt, mit einer einzigen plasmidhaltigen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Übernachtskultur zu 500 ml antibiotikumhaltigem LB-Medium zugegeben und für 14-18 Stunden bei 37°C im Warmluftinkubator geschüttelt (eine andere Möglichkeit war die Anzucht im Fermenter, was zu wesentlich höheren Ausbeuten führte). Die Bakterien wurden durch eine Zentrifugation (10500xg, 10 Minuten, 25°C, GSA-Rotor) gesammelt, in 10 ml Lysozympuffer (50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 4 mg/ml Lysozym)

suspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Nach Zugabe von 20 ml 0.2 N NaOH + 1% SDS stand die Suspension für 5-10 Minuten in einem Eisbad. Auf den Zusatz von 15 ml 3 M Natriumacetatlösung (pH 4.8) folgte eine sechzigminütige Inkubation auf Eis. Die zelluläre DNA und Bakterientrümmern wurden abzentrifugiert (23300xg, 15 Minuten, 4°C, HB 4-Rotor) und der Überstand mit 2.5 Volumina Ethanol vermischt. Nach 5-10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die ausgefällten Nukleinsäuren gesammelt (16000xg, 15 Minuten, 25°C, HB 4-Rotor), mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 8 ml TE-Puffer gelöst. Die Lösung wurde mit CsCl (1.1 g/ml) und Ethidiumbromid (0.62 mg/ml) versetzt und gut durchgemischt. Die Abtrennung der dabei ausgefallenen Aggregate erfolgte durch eine Zentrifugation (10500xg, 10 Minuten, 25°C, HB 4-Rotor). Das gereinigte Gemisch wurde anschließend in Zentrifugationsröhrchen überführt und in einem SW 65-Rotor bei 25°C ultrazentrifugiert (159000xg, 48 Stunden). Bei Tageslicht waren in dem SW 65-Röhrchen zwei DNA-Banden zu erkennen: Die obere Bande setzte sich aus linearer Bakterien-DNA und geöffneter, zirkulärer Plasmid-DNA zusammen; die untere Bande bestand aus geschlossener, zirkulärer Plasmid-DNA ("supercoil"-Form). Diese wurde abgenommen, mit CsCl-Lösung (1 ml TE-Puffer, 1.1 g CsCl, 0.62 mg Ethidiumbromid) verdünnt und zur weiteren Aufreinigung in einem Vertikalrotor zentrifugiert (151000xg, 25°C, 7 Stunden, TV 865-Rotor). Die saubere Plasmid-Bande (das Plasmid liegt ausschließlich in der "supercoil"-Form vor) wurde vorsichtig abgenommen und das interkalierte Ethidiumbromid mit 1-Butanol, das mit einer 4 M NaCl-Lösung gesättigt war, extrahiert. Nach 4-6 Extraktionsschritten war die wäßrige Lösung mit 3 Volumina TE-Puffer zu verdünnen; die DNA ließ sich mit Ethanol ausfällen. Die präzipitierte Nukleinsäure wurde abzentrifugiert (16000xg, 15 Minuten, 4°C, HB 4-Rotor), mit 70% Ethanol gewaschen und das Sediment getrocknet. Die Plasmid-DNA ließ sich in TE-Puffer lösen und bei 4°C lagern.

2.6. Restriktionsanalyse:

2.6.1. Verdauung mit Restriktionsenzymen:

Bei Restriktionsverdauungen wurden DNA-Moleküle entsprechend den Empfehlungen der Hersteller bei 37°C mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Durchführung jeder Verdauung geschah in Gegenwart von 100 µg/ml BSA. Nach Ablauf der Reaktion wurde dem Ansatz 1/4 Volumen DNA-Probenpuffer (50% Glycerin, 5 x DNA-Elektrophoresepuffer, 0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol FF) hinzugefügt und die gespaltene DNA in Agarosegelen analysiert.

2.6.2. DNA-Elektrophorese:

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte mit Hilfe von horizontalen Agarosegelen (0.8-1.8% Agarose). Es ließ sich folgender Elektrophoresepuffer verwenden: 4.84% Tris; 1.64% Natriumacetat; 0.74% EDTA; pH 8.3. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in Ethidiumbromidlösung (0.5 µg/ml Ethidiumbromid in Elektrophoresepuffer) getaucht und die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.6.3. Rückgewinnung von DNA aus Agarosegelen:

Die Rückgewinnung von DNA-Molekülen aus Agarosegelen ließ sich mit Hilfe von vorbehandeltem DE 81-Papier (Whatman) vollziehen (DE 81-Papier wurde für 3-5 Stunden in 2.5 M NaCl belassen, anschließend mit H₂O gewaschen und in 1 mM EDTA bei 4°C gelagert).

Ein der Geldicke entsprechender Streifen DE 81-Papier wurde vor die zu eluierende DNA-Bande in das Agarosegel eingesetzt. Die DNA wurde auf das Zellulosepapier elektrophoriert und das DNA-haltige Papier anschließend 30 Minuten bei 4°C in H₂O gewaschen. Die Elution der Nukleinsäure aus dem DE 81-Papier erfolgte durch eine zweistündige Inkubation bei 37°C. Für jeweils 50 mm² Papier waren 0.4 ml Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA; 1.5 M NaCl) notwendig. Das Zellulosepapier ließ

sich nach der Inkubation abfiltrieren. Das Filtrat wurde phenolextrahiert und die DNA durch eine Ethanolfällung präzipitiert.

2.6.4. "Southern-Blot":

Für den Transfer von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen auf Nitrozellulosepapier kam die von Southern entwickelte Technik zur Anwendung (36).

Die nach einer Restriktionsverdauung erhaltenen DNA-Stücke wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde nach der abgeschlossenen Elektrophorese in Ethidiumbromidlösung gefärbt und unter UV-Licht im Dunkeln fotografiert. Daraufhin schloß sich die Denaturierung der DNA im Gel an: Das Gel wurde zweimal für 20 Minuten in Denaturierungslösung (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) vorsichtig geschüttelt und anschließend auf die gleiche Weise neutralisiert (Neutralisationspuffer: 0.5 M Tris-HCl, pH 7.4; 3 M NaCl). Zwei Lagen Whatman 3MM-Papier wurden um eine Glasplatte gewickelt. Die Glasplatte wurde derart auf eine mit Reservoirpuffer (6 x SSC) gefüllte Schale gelegt, daß die Enden des Papiers in den Puffer eintauchten. Das neutralisierte Agarosegel wurde auf das feuchte 3MM-Papier gelegt und mit einer wasserdichten Einfassung umgeben. Auf das Agarosegel kam ein gleich großes Stück Nitrozellulosepapier, das vorher in 6 x SSC eingeweicht worden war. Das Nitrozellulosepapier wurde mit einer Lage trockenem 3MM-Papier belegt und mit einer Schicht Papiertücher als Saugmaterial. Die Papiertücher waren anschließend mit einer Glasplatte zu bedecken, die durch ein aufgelegtes Gewicht den Papierstapel zusammendrückte.

Der Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Am darauffolgenden Tag wurde das Nitrozellulosepapier an der Luft getrocknet und anschließend für 2 Stunden bei 80°C im Vakuum gebacken. Die "Blots" ließen sich bei Raumtemperatur zwischen zwei Lagen 3MM-Papier in Alufolie eingewickelt aufbewahren. Zur Hybridisierung wurden von den "Blots" schmale, 2-3 mm breite Streifen abgeschnitten,

zu einer Spirale gewickelt und in Plastikröhrchen, wie unter 2.7.2. erläutert, hybridisiert.

2.7. Filterhybridisierung:

2.7.1. Beladen der Filter:

Die aufzutragende Menge an DNA (in TE-Puffer gelöst) wurde zur Denaturierung für 3 Minuten in einem siedenden Wasserbad erhitzt. Die unerwünschte Renaturierung der DNA ließ sich durch eine sofortige Abkühlung der Lösung in einem Eisbad verhindern. Die DNA-Lösung wurde auf einen Gehalt von 10 x SSC eingestellt und mit einer Mikropipette auf kleine Nitrozellulosefilter aufgetragen, die vorher in 4 x SSC eingeweicht worden waren (Filterdurchmesser: 9 mm, 2-5 µg denaturierte DNA pro Filter). Zum Beladen wurden die Filter auf eine Lage Whatman 3MM-Papier (vorher mit 4 x SSC angefeuchtet) gelegt, unter der sich ein Stapel Papiertücher befand. Die beladenen Nitrozellulosefilter trockneten zunächst an der Luft; danach folgte ein zweistündiges Backen der Filter bei 80°C im Vakuum.

Plasmid-DNA war vor dem Denaturieren mit einem Restriktionsenzym zu linearisieren.

Die beladenen Rundfilter ließen sich ebenfalls bei Raumtemperatur lagern.

2.7.2. Hybridisierung:

Die Hybridisierung mit beladenen Nitrozellulosefiltern erfolgte in Kunststoffröhrchen (2-4 Filter pro Röhrchen) mit einem Innendurchmesser von 13 mm. Für die Vorhybridisierung, die mindestens 4 Stunden bei 42°C betrug, waren 500 µl Lösung (siehe 2.4.1.2.) pro Röhrchen notwendig. Nach dem Abnehmen der Vorhybridisierungslösung wurden zu den Filtern unterschiedliche Volumina (300-500 µl) an Hybridisierungslösung (siehe 2.4.1.2.) zugesetzt. Zur Ausbildung von DNA-RNA-Hybriden wurden die Plastikgefäße bei 42°C für 18-24 Stunden inkubiert. Unspezifisch gebundene RNA-Moleküle wurden wie unter 2.4.1.2. beschrieben von den

Filtern abgewaschen, jedoch bei 60°C.

Bei Kompetitionshybridisierungen waren die Filter in Gegenwart von unmarkierter RNA (35 µg/ml) für 24 Stunden bei 42°C vorzuhybridisieren. Nach dem Zusatz der radioaktiv markierten RNA wurde die Inkubation für 18-24 Stunden fortgesetzt.

Der Nachweis der hybridisierten RNA-Moleküle erfolgte aufgrund ihrer radioaktiven Markierung mit Hilfe eines Szintillationszählers.

2.7.3. RNase T₁-Behandlung:

Als Nachweis für perfekte Hybride und zur Lokalisation der 5'-Enden von RNA-Molekülen wurden die nach der Hybridisierung gebildeten RNA-DNA-Hybride einer RNase T₁-Verdauung unterzogen.

Hierzu wurden die gewaschenen Nitrozellulosefilter zweimal für jeweils 15 Minuten bei Raumtemperatur in TKE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.33 M KCl; 1 mM EDTA) äquilibriert. Dies diente zur Entfernung von SDS-Resten. Nach dem Umsetzen der Filter in frischen TKE-Puffer folgte eine dreißigminütige RNase T₁-Verdauung bei Raumtemperatur (30 Einheiten RNase T₁/ml). Die abgespaltenen RNA-Fragmente ließen sich durch kurzes Waschen (3-5 Minuten) mit TKE-Puffer entfernen. Schließlich wurde die Ribonuklease durch eine dreißigminütige Behandlung mit Jodessigsäurelösung (0.15 M Jodessigsäure; 0.1 M Essigsäure; 0.33 M Kaliumchlorid; pH 5.2) bei 37°C inaktiviert. Die geschützten RNA-Fragmente wurden wie unter 2.7.4. beschrieben aus den Hybriden zurückgewonnen und analysiert.

2.7.4. Elution von RNA aus Hybriden:

Zum Abwaschen der hybridisierten RNA-Moleküle wurden die Nitrozellulosefilter für 3 Minuten in 0.5%iger SDS-Lösung auf 95°C erhitzt. Die freigesetzte RNA wurde durch eine Ethanol-fällung in Gegenwart von 0.2 M NaCl und 50 µg/ml tRNA ausgefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und auf Polyacrylamidgelen analysiert.

2.8. Strangtrennung:

Einzelstrang-DNA lässt sich mit Hilfe von Exonuklease III erzeugen. Exonuklease III besitzt eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, die spezifisch für Doppelstrang-DNA ist. Die Verdauung eines linearen Doppelstrangs beginnt an den freien 3'-Enden eines jeden DNA-Strangs. Die Produkte einer kompletten Verdauung sind zwei Einzelstrang-Moleküle, von denen jedes ungefähr halb so lang ist wie die ursprüngliche Doppelstrang-DNA. Meistens erhält man zusätzlich ein drittes Produkt, bei dem die beiden Einzelstränge an ihren 3'-Enden über eine kleine Region Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet haben (37).

Die Linearisierung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe eines Restriktionsenzym. Nach der Verdauung wurde die DNA phenolextrahiert, mit Ethanol gefällt und nach einer Zentrifugation in Exo III-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM DTT; 5 mM $MgCl_2$) gelöst. Nach dem Zusatz von Exonuklease III (2 Einheiten/1 μg DNA) zu der Lösung folgte eine sechzigminütige Inkubation bei 37°C (DNA-Konzentration: 1 μg /2.5 μl). Danach wurde DNA-Elektrophorese-puffer hinzugefügt, die Einzelstränge in einem Agarosegel aufgetrennt und auf Nitrozellulosepapier transferiert (siehe 2.6.). Die entsprechenden "Southern-Blots" wurden mit den RNA-Spezies hybridisiert, deren codierender Strang zu bestimmen war.

3. Ergebnisse:

3.1. "Fingerprint"-Analysen von niedermolekularen Kern-RNAs:

Lange Zeit existierten keine detaillierten Informationen über die Biosynthese der snRNAs. Jedoch gab es Hinweise, daß möglicherweise RNA-Polymerase I die snRNAs transkribiert (9), und daß snRNA-Moleküle über Vorläufer synthetisiert werden, die nur wenig größer als die reifen snRNAs sind (7, 38). Diese Daten stammen aus Experimenten, die unter in vivo Bedingungen durchgeführt wurden, d.h. in intakten Zellen. Hingegen war es bisher nicht möglich, die in vitro Synthese der snRNAs in isolierten Zellkernen nachzuweisen. Mit den snPI RNA-Molekülen stand allerdings eine Klasse niedermolekularer Kern-RNAs zur Verfügung, die in isolierten Zellkernen von RNA-Polymerase I synthetisiert werden und durchschnittlich größer als die snRNAs sind. Da über die Funktion der snPI RNA-Spezies nichts bekannt war, ergab sich als Arbeitshypothese, daß snPI RNA-Moleküle möglicherweise Kandidaten für snRNA-Vorläufer darstellen.

Daher war das Ziel der ersten Experimente, mögliche Sequenzhomologien zwischen den beiden Populationen niedermolekularer RNAs zu untersuchen. Für diese Versuche wurden Maus-Zellen gewählt, da sich Maus snPI RNAs in ihrer Größe teilweise nur wenig von den Maus snRNAs unterscheiden.

Die in vitro Transkription mit Zellkernen, die aus mit Actinomycin D (0.040 µg/ml) vorbehandelten Maus 3T6-Zellen isoliert wurden, in Gegenwart von 200 µg/ml α-Amanitin führte zu einer Reihe niedermolekularer RNA-Spezies, die als snPI RNAs definiert wurden (18, 19; Abb.1,3). Bei den Produkten handelt es sich um RNA-Polymerase I-Transkripte, da die RNA-Polymerasen II und III durch 200 µg/ml α-Amanitin inhibiert wurden. Die RNA-Synthese mit 10 µg/ml α-Amanitin im Ansatz ergab zusätzlich zu den snPI RNAs die RNA-Polymerase III-Produkte 5S rRNA und tRNA, da durch die niedrige α-Amanitinkonzentration nur RNA-Polymerase II inaktiviert wurde (Abb.1,2). Die beiden beschriebenen Experimente wurden nach Vorbehandlung der Zellen mit 0.040 µg/ml Actinomycin D durchgeführt; bei dieser Konzentration

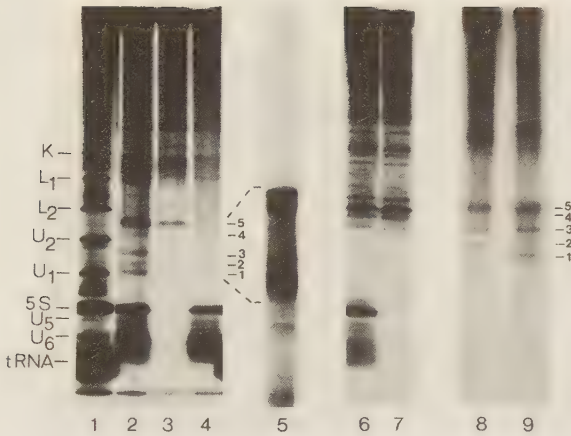


Abb.1: Elektrophoretische Analyse niedermolekularer RNAs (4-10% SDS-Polyacrylamidgele)

- 1) Marker (Niedermolekulare, zytoplasmatische RNA, die nach einer dreistündigen in vivo Markierung mit ^3H -Uridin (40 $\mu\text{Ci/ml}$) aus 3T6-Zellen isoliert wurde).
 - 2) Niedermolekulare Kern-RNAs, die in vitro mit Zellkernen aus mit Actinomycin D (0.040 $\mu\text{g/ml}$) vorbehandelten Maus 3T6-Zellen in Gegenwart von 10 $\mu\text{g/ml}$ α -Amanitin synthetisiert wurden.
 - 3) Wie 2), jedoch mit 200 $\mu\text{g/ml}$ α -Amanitin (Maus snPI RNA).
 - 4) Wie 2), allerdings ohne Actinomycin D-Vorbehandlung.
 - 5) Reelektrophorese der Maus snPI RNA-Banden 1-5 in einem 8%igen Polyacrylamidgele, das 7 M Harnstoff enthält.
 - 6) Niedermolekulare Kern-RNAs, die in vitro mit Zellkernen aus mit Actinomycin D (0.040 $\mu\text{g/ml}$) vorbehandelten HeLa-Zellen in Gegenwart von 10 $\mu\text{g/ml}$ α -Amanitin synthetisiert wurden.
 - 7) Wie 6), jedoch mit 200 $\mu\text{g/ml}$ α -Amanitin (HeLa snPI RNA).
- Die in 2-7 gezeigten RNAs wurden mit ^3H -UTP radioaktiv markiert.
- 8) Mit ^{32}P -UTP markierte Maus snPI RNAs direkt analysiert (Synthesebedingungen wie in 3).
 - 9) Elektrophoretische Auftrennung von ^{32}P -markierter Maus snPI RNA, die nach der Hybridisierung an einen Maus rDNA-Klon wieder erhalten wurde.

wird die ribosomale RNA-Synthese selektiv gehemmt (28). Die snPI RNAs sind jedoch kein Artefakt dieser Actinomycin D-Behandlung, die sie auch in Abwesenheit des Inhibitors synthetisiert wurden (Abb.1,4). Zum qualitativen Vergleich sind die HeLa snPI RNAs gegenüber gestellt (Abb.1,6 und 7), deren Mitglieder alle größer sind als die prominentesten Moleküle der Maus snPI RNAs. Beim Vergleich von Maus snPI RNA (Abb.1,3) mit Maus snRNA (Abb.1,1) wird deutlich, daß sich die beiden Spektren bezüglich der Molekülgrößen stark ähneln. Die Maus snPI RNA-Spezies 1-5 liegen in der gleichen Größenordnung wie die Maus snRNAs U_1 und U_2 und scheinen zum Teil sogar direkt übereinzustimmen.

Aufgrund der angeführten Argumente wurden die Oligonukleotidzusammensetzungen ("Fingerprints", siehe 2.2.11.) von snRNAs und snPI RNAs miteinander verglichen (siehe Abb.2.).

"Fingerprints" liefern ein für jedes RNA-Molekül typisches Oligonukleotidmuster. Da RNA-Vorläufer und die entsprechenden reifen RNAs teilweise gleiche Sequenzen enthalten, sollten sich die nach RNase T_1 erhaltenen Oligonukleotidmuster der beiden RNA-Populationen stark ähneln.

Zur Isolierung der snRNA-Spezies U_1 und U_2 (vergleiche Abb.1,1) wurden Maus-Zellen für 36 Stunden in vivo mit ^{32}P -Orthophosphat markiert. Die phenolextrahierten Kern-RNAs wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, die entsprechenden snRNA-Moleküle isoliert und einer "Fingerprint"-Analyse unterzogen. Die Synthese der snPI RNAs erfolgte in vitro in Gegenwart von 0.040 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D, 200 $\mu\text{g/ml}$ α -Amanitin und α - ^{32}P -UTP. Die RNA-Moleküle wurden anschließend ebenfalls in Polyacrylamidgelen analysiert und die Spezies 1, 2, 3 und 5 (vergleiche Abb.1,3) isoliert. Nach einer RNase T_1 -Verdauung ließen sich die resultierenden Oligonukleotide in einem zweidimensionalen Elektrophoresesystem auftrennen.

Die Spektren der snRNA-Moleküle U_1 und U_2 unterscheiden sich deutlich von denen der snPI RNAs 1, 2, 3 und 5 (vergleiche Abb.2.). Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, daß die beiden RNA-Klassen keine gemeinsamen RNA-Sequenzen enthalten, und daß snPI RNAs keine Vorstufen der snRNAs darstellen können.

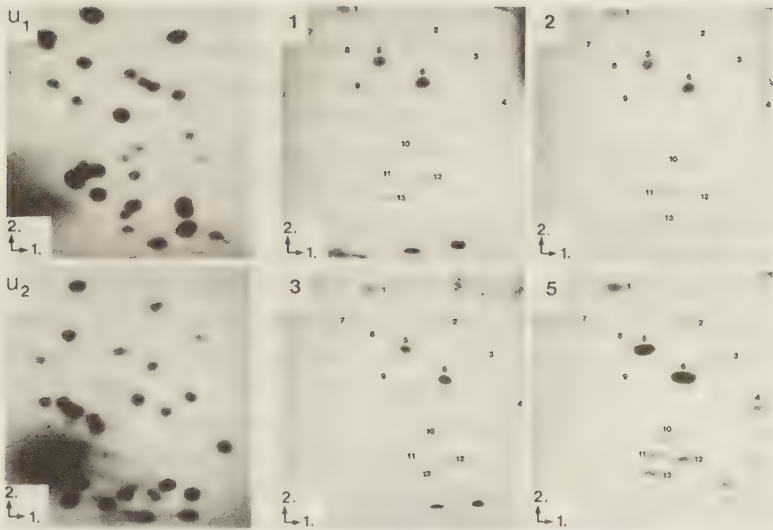


Abb.2: "Fingerprint"-Analysen von Maus snRNAs und Maus snPI RNA-Molekülen

Maus 3T6-Zellen wurden für 36 Stunden mit ^{32}P -Orthophosphat markiert und anschließend die snRNA-Spezies U_1 und U_2 aus den Zellkernen isoliert.

Die snPI RNAs 1, 2, 3 und 5 wurden in vitro mit isolierten Zellkernen in Gegenwart von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ α -Amanitin und α - ^{32}P -UTP synthetisiert (die Zellen wurden mit 0.040 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Actinomycin D vorbehandelt).

Einzelne RNA-Banden wurden aus den Gelen ausgeschnitten, elektrophoretisch eluiert und anschließend analysiert.

1. Dimension: Elektrophorese
2. Dimension: Homochromatographie

Überraschend ist, daß die vier analysierten snPI RNAs qualitativ identische Oligonukleotidmuster zeigen - alle RNAs besitzen die Oligonukleotide 1-13 -, obwohl sich die RNA-Moleküle zum Teil um über 100 Nukleotide in der Länge unterscheiden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß sich die Maus snPI RNAs aus Aggregaten der gleichen Moleküle zusammensetzen. Dies ist jedoch nicht der Fall, da die Reelektrophorese der snPI RNA-Moleküle 1-5 unter denaturierenden Bedingungen - in Gegenwart von 7 M Harnstoff - wiederum zu einzelnen RNA-Banden mit den entsprechenden Längenunterschieden führte (Abb.1,5). Da die zweidimensionalen RNase T₁-Spektren von längeren snPI RNAs keine zusätzlichen Oligonukleotide aufweisen, und die snPI RNAs nicht aus Aggregaten kleinerer Moleküle bestehen, ist es sehr wahrscheinlich, daß die Maus snPI RNA-Moleküle repetitive (sich wiederholende) Sequenzen enthalten.

3.2. Lokalisation der Maus snPI RNA-Gene:

SnPI RNA-Moleküle sind im wesentlichen durch drei Merkmale charakterisiert:

- 1) Die RNAs werden von RNA-Polymerase I transkribiert, ein Enzym, von dem man annahm, daß es ausschließlich für die Synthese der ribosomalen Vorläufer-RNA (45S rRNA) verantwortlich ist.
- 2) Weiterhin zeigen die snPI RNAs eine ausgeprägte Speziesspezifität, d.h., sie stellen in verschiedenen eukaryotischen Organismen ausgesprochen unterschiedliche RNA-Spektren dar.
- 3) Außerdem weisen die erwähnten RNA-Sequenzanalysen auf repetitive Sequenzen innerhalb der snPI RNA-Moleküle hin.

Diese letzten beiden Punkte haben die snPI RNAs mit den zwischen den ribosomalen Genen liegenden sogenannten nicht transkribierten Zwischensequenzen ("nontranscribed spacer sequences", NTS) gemeinsam (39-47). Auch die Verwendung der gleichen RNA-Polymerase für die Synthese von

snPI RNA und ribosomaler RNA deuten auf einen möglichen Zusammenhang der snPI RNA mit den ribosomalen Gen-Sequenzen. Diese Vermutung wird zusätzlich durch Ergebnisse unterstützt, die gezeigt haben, daß NTS-Regionen teilweise doch transkribiert werden (48-53). Aufgrund der angeführten Argumente wurden Maus snPI RNAs mit einem Maus rDNA-Klon, der auch NTS-Sequenzen enthält, hybridisiert.

Die Struktur des verwendeten ribosomalen Maus-Klons λ gtWES Mr 974, der freundlicherweise von Dr. I. Grummt (Würzburg) zur Verfügung gestellt wurde, ist in Abb.3. wiedergegeben (54). Die Insertion des λ -Klons enthält vier Fünftel des 18S rRNA-Gens, den gesamten externen transkribierten "spacer" und ca. 6.7 kb der sogenannten nicht transkribierten Zwischensequenz.

Durch in vitro Transkription mit isolierten Zellkernen synthetisierte Maus snPI RNA wurde an Nitrozellulosefilter hybridisiert, die mit Mr 974-DNA beladen waren. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, zeigt snPI RNA eine deutliche Hybridisierung an den rDNA-Klon. Wurde die hybridisierte RNA von den Filtern eluiert und auf einem 6-15% SDS-Polyacrylamidgel reanalysiert (vergleiche 2.7.4.), so trat das typische Maus snPI RNA-Spektrum hervor (Abb.1,8 und 9). Dieses Experiment belegt, daß von den in vitro transkribierten Produkten nur Maus snPI RNAs an den ribosomalen Klon hybridisieren (die Synthese von ribosomaler RNA wurde wie beschrieben durch Actinomycin D inhibiert).

Um zu verifizieren, daß die für snPI RNA codierenden DNA-Sequenzen im nicht transkribierten "spacer" liegen, wurde eine Hybridisierung in Gegenwart von unmarkierter 45S rRNA, die aus Nukleoli isoliert wurde (siehe 2.2.3.), ausgeführt (Kompetitions-hybridisierung). Für die Kompetitions-hybridisierung mußten die mit Mr 974-DNA beladenen Nitrozellulosefilter zunächst für 24 Stunden mit einem großen Überschuß an unmarkierter 45S rRNA (35 μ g/ml) vorhybridisiert werden. Während dieser Vorhybridisierung werden aufgrund der hohen 45S rRNA-Konzentration fast alle zur 45S rRNA komplementären DNA-Sequenzen, d.h. ETS- und 18S rRNA-Sequenzen,

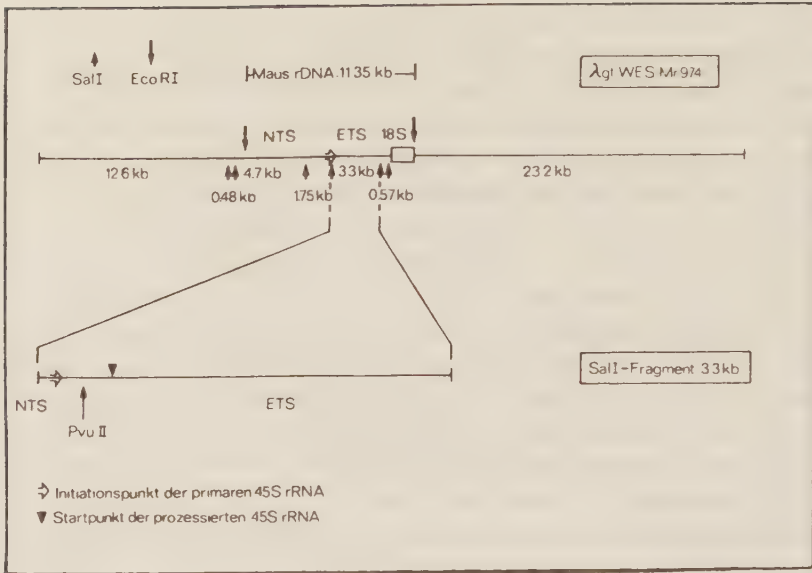


Abb.3: Restriktionskarte des ribosomalen Maus-Klons λ gtWES Mr 974 und des 3.3 kb Sal I-Fragments (vergleiche 54 und 55)

Jeweils die Spitze des offenen Pfeils $\rightarrow$ gibt den genauen Initiationspunkt der 45S rRNA an.

mit der ribosomalen RNA abgesättigt. Somit standen praktisch nur noch NTS-Sequenzen für eine RNA-Hybridisierung zur Verfügung. An die Vorhybridisierung mit unmarkierter 45S rRNA schloß sich eine achtzehnstündige Hybridisierung mit radioaktiv markierter Maus snPI RNA an. Die Filter wurden gewaschen und im Szintillationszähler gezählt. Die Hybridisierung von snPI RNA an die DNA-Sequenzen läßt sich nicht durch einen Überschuß an unmarkierter 45S rRNA beeinflussen (siehe Tabelle 1), was darauf hinweist, daß die snPI RNA-Gene außerhalb des 45S rRNA-Gens liegen.

Als Kontrolle wurde eine Kompetitionsybridisierung mit

Tabelle 1: Hybridisierung von Maus RNA an λ gtWES Mr 974
Maus rDNA

Eingesetzte RNA-Probe	Menge an hybridisierter RNA
1) 50000 cpm ^3H -Maus snPI RNA	3049 cpm
2) 50000 cpm ^3H -Maus snPI RNA in Gegenwart von 35 $\mu\text{g/ml}$ 45S rRNA	2958 cpm
3) 30000 cpm ^{32}P -Maus 45S rRNA	277 cpm
4) 30000 cpm ^{32}P -Maus 45S rRNA in Gegenwart von 35 $\mu\text{g/ml}$ 45S rRNA	19 cpm

Die Hybridisierung erfolgte für 18 Stunden bei 42°C in einem Volumen von 300 μl . Jedes Röhrchen enthielt 2 Filter mit jeweils 5 μg Maus rDNA und einen Filter mit 5 μg E.Coli-DNA (Blankfilter). Die Werte für die Blankfilter (20-50 cpm) wurden in der Tabelle berücksichtigt.

radioaktiv markierter 45S rRNA durchgeführt. Erwartungsgemäß läßt sich die Hybridisierung der radioaktiv markierten 45S rRNA durch eine Vorhybridisierung mit einem Überschuß an unmarkierter 45S rRNA stark zurückdrängen (vergleiche Tabelle 1). Dieses Ergebnis zeigt, daß die Abdeckung von ribosomaler DNA durch eine Vorhybridisierung mit unmarkierter 45S rRNA tatsächlich ausreichend ist.

Zur Lokalisation der Maus snPI RNA-Gene innerhalb der Mr 974-DNA wurde dann markierte snPI RNA an einzelne Fragmente des ribosomalen Klons hybridisiert:

Dazu wurde die klonierte Maus-DNA mit der Restriktionsendonuklease Sal I verdaut, wodurch sich Fragmente folgender Größe bildeten: 23.2 kb, 12.6 kb, 4.7 kb, 3.3 kb, 1.75 kb, 0.57 kb und 0.48 kb (vergleiche Abb.3.). Die DNA-Fragmente wurden in einem 0.8%igen Agarosegel aufgetrennt (Abb.4,2) und nach dem Transfer auf Nitrozellulosepapier mit markierter Maus snPI RNA (50000 cpm) für 18

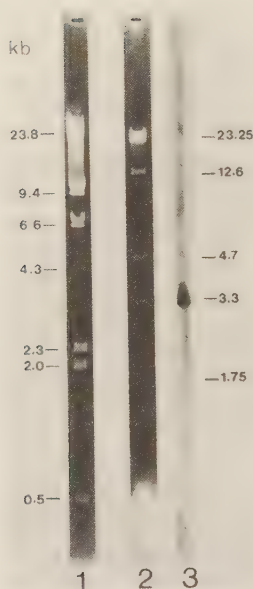


Abb.4: Hybridisierung von Maus snPI RNA an Sal I-Restriktionsfragmente der λ gtWES Mr 974-DNA

Das Agarosegel (0.8%) wurde nach beendeter Elektrophorese in Ethidiumbromidlösung gefärbt und unter UV-Licht im Dunkeln fotografiert. Durch diese Behandlung ließen sich die aufgetrennten Restriktionsfragmente sichtbar machen (vergleiche 1) und 2). Die DNA-Fragmente wurden anschließend auf Nitrozellulosepapier transferiert ("Southern-Blot") und mit radioaktiv markierter RNA hybridisiert. Daraufhin wurden die "Blots" gewaschen und wie beschrieben autoradiographiert (vergleiche 3).

- 1) Marker (λ -DNA nach der Verdauung mit der Restriktionsendonuklease Hind III).
- 2) Sal I-Restriktionsfragmente der Mr 974-DNA.
- 3) Autoradiogramm des "Southern-Blots" von 2) nach Hybridisierung mit Maus snPI RNA.

Stunden bei 42°C in einem Volumen von 0.4 ml hybridisiert. Das Autoradiogramm dieses "Blots" ist in Abb.4,3 wiedergegeben. Danach hybridisiert Maus snPI RNA ausschließlich an das 3.3 kb Sal I-Fragment, welches sowohl ETS-Sequenzen, als auch Bereiche des nicht transkribierten "spacers" enthält (vergleiche Abb.3.).

Für die genauere Bestimmung des Hybridisierungsortes innerhalb dieses Sal I-Fragments wurde die 3.3 kb-Bande (Abb.5,2) elektrophoretisch eluiert und mit dem Restriktionsenzym Pvu II nachgeschnitten. Dabei entstand ein 461 bp langes Fragment, das NTS- und ETS-Regionen enthält, und ein 2.8 kb-Fragment, welches nur aus externem transkribierten "spacer" besteht (vergleiche Abb.3.). Diese beiden Restriktionsfragmente wurden in einem 0.8%igen Agarosegel analysiert (Abb.5,3) und auf Nitrozellulosepapier transferiert. Die Hybridisierung des entsprechenden "Southern-Blots" erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die der Sal I-Fragmente mit Maus snPI RNA.

Das Autoradiogramm in Abb.5,4 macht deutlich, daß beide Pvu II/Sal I-Fragmente Sequenzen enthalten, die komplementär zu Maus snPI RNA sind.

Eine Behandlung der RNA-DNA-Hybride mit pankreatischer Ribonuklease hat keinen Einfluß auf die hybridisierte RNA (Abb.5,5). Somit beruht die Hybridisierung von Maus snPI RNA an die beiden Pvu II/Sal I-DNAs nicht auf der Ausbildung von zufälligen, unvollständigen Hybriden, da die Ribonuklease nicht hybridisierte RNA-Fragmente abbaut.

Bei einer Kompetitions-hybridisierung mit unmarkierter 45S rRNA verändert sich das Hybridisierungsmuster ebenfalls nicht; Maus snPI RNA hybridisiert in Gegenwart eines Überschusses an unmarkierter 45S rRNA an die beiden DNA-Fragmente (Abb.5,6).

Dies ist sehr überraschend, da das 2.8 kb Pvu II/Sal I-Fragment ausschließlich Sequenzen enthält, die zum 45S rRNA-Gen gehören. Eine Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch liefert das Prozessierungsschema der Maus 45S rRNA:

Neuere Ergebnisse (26, 55 und 56) haben nämlich gezeigt, daß Maus 45S rRNA aus zwei Spezies besteht, die sich in ihrer Größe um ca. 650 Basenpaare am 5'-Ende unterscheiden.

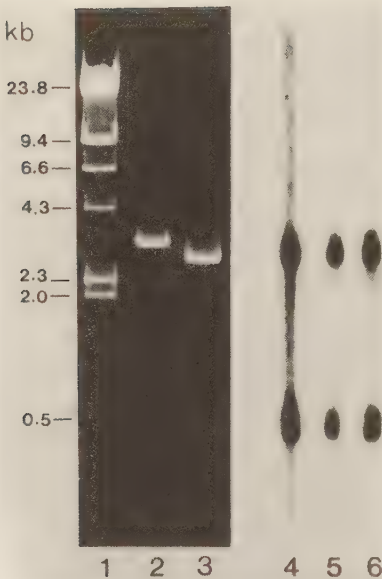


Abb.5: Auftrennung des mit Pvu II verdauten 3.3 kb Sal I-Fragments und Hybridisierung mit Maus snPI RNA (0.8%iges Agarosegel)

- 1) Marker (λ -DNA mit Hind III geschnitten)
- 2) Reelektrophorese des aus Mr 974-DNA isolierten 3.3 kb Sal I-Fragments.
- 3) Elektrophoretische Analyse des mit Pvu II geschnittenen 3.3 kb Sal I-Fragments.
- 4) "Southern-Blot" von 3), der mit Maus snPI RNA hybridisiert wurde.
- 5) Wie 4), jedoch wurde der gewaschene Nitrozellulosestreifen für 30 Minuten bei 37°C mit pankreatischer Ribonuklease (50 μ g/ml) inkubiert.
- 6) Wie 4), allerdings wurde vor der Zugabe von markierter Maus snPI RNA eine 24stündige Vorhybridisierung mit unmarkierter 45S rRNA (35 μ g/ml) durchgeführt (Kompetitions-hybridisierung).

Die längere 45S rRNA ist das primäre Transkriptionsprodukt und wird an der mit ➞ bezeichneten Stelle initiiert (siehe Abb.3.). Die kürzere 45S rRNA wird durch das Abschneiden der ersten 650 Nukleotide vom 5'-Ende der primären 45S rRNA erzeugt und beginnt innerhalb des 2.8 kb Pvu II/Sal I-Fragments (vergleiche Abb.3.). Die primäre 45S rRNA ist eine kurzlebige Vorstufe, die nur in geringen Mengen vorkommt, während die kleinere 45S rRNA ca. 90-95% der gesamten 45S rRNA ausmacht. Die für die Kompetitionshybridisierung verwendete 45S rRNA besteht somit vorwiegend aus dem kleineren 45S rRNA-Molekül und deckt folglich nur einen Teil des 2.8 kb Pvu II/Sal I-Fragments mit ab. Daher sind - außer im 461 bp-Fragment - auch in dem 2.8 kb-Stück DNA-Sequenzen vorhanden, an die Maus snPI RNA auch in Gegenwart von "45S rRNA" hybridisieren kann.

Die Ergebnisse, die aus den Experimenten mit Maus snPI RNA resultieren, lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- 1) Es existiert keine Beziehung zwischen snPI RNAs und snRNA-Molekülen.
- 2) Die für Maus snPI RNA codierenden DNA-Sequenzen liegen in der Nähe des Initiationspunktes der 45S rRNA-Transkription.

Während der Durchführung der Maus snPI RNA-Experimente war der richtige 45S rRNA-Initiationspunkt (➞, vergleiche Abb.3.) nicht bekannt. Vielmehr glaubte man damals, daß der Startpunkt der prozessierten 45S rRNA, der in Abb.3. mit ▼ angegeben wurde, der Initiationspunkt der 45S rRNA wäre (26,55,56). Die in Abb.5. gezeigten Ergebnisse führten deshalb zunächst zu der Annahme, daß Maus snPI RNAs ausschließlich durch NTS-Sequenzen codiert werden. Mit der Grundlage des ursprünglichen 45S rRNA-Initiationspunktes würden nämlich das 461 bp Pvu II/Sal I-Fragment ausschließlich, und das 2.8 kb-Fragment teilweise, NTS-Sequenzen enthalten. Mit der Verlegung des 45S rRNA-Startpunkts an die mit ➞ markierte Stelle (Abb.3.) verlor jedoch die Vermutung, daß snPI RNA ausschließlich von NTS-

Sequenzen transkribiert werden, ihre Gültigkeit. Es war jedoch nicht auszuschließen, daß snPI RNAs innerhalb des 461 bp-Fragments an Regionen des nicht transkribierten "spacers" hybridisieren.

Um mehr Klarheit bezüglich der Lokalisation der snPI RNA-Gene zu erhalten, mußten Experimente durchgeführt werden, die eine genauere Bestimmung des Genortes ermöglichten. Diese Versuche wurden jedoch nicht mit Maus-Zellen durchgeführt, da ihre Ausführung im Maus-System mit einem relativ hohen Aufwand an Material und Zeit verbunden wäre. Vielmehr wurden die Untersuchungen mit HeLa-Zellen fortgesetzt, in denen die snPI RNA-Moleküle ursprünglich entdeckt wurden. Die folgenden Gründe favorisieren dieses System:

- 1) HeLa snPI RNAs sind die am besten charakterisierten snPI RNA-Moleküle.
- 2) HeLa-Zellen lassen sich wesentlich leichter kultivieren als Maus 3T6-Fibroblasten, die nur in Form von einschichtigen Zellrasen wachsen.
- 3) Aufgrund der großen Menge an degradierenden Enzymaktivitäten sind für die Isolierung von ausreichenden RNA-Mengen aus 3T6-Zellen im Vergleich zu HeLa-Zellen sehr viel Zeit und Material notwendig.

Um die Fortsetzung der Arbeiten im HeLa-System zu ermöglichen, war zunächst ein Klon menschlicher DNA zu isolieren, der snPI RNA-Sequenzen trägt.

3.3. Isolierung eines ribosomalen Klons aus einer menschlichen Genbibliothek:

3.3.1. Identifizierung von 18S rRNA-Klonen:

Aufgrund der Lokalisation der snPI RNA-Gene in der Nähe des 45S rRNA-Transkriptionsstarts war die Suche nach einem snPI RNA-Klon gleichbedeutend mit der Aufgabe, einen Klon menschlicher DNA zu isolieren, der die Initiationsregion der 45S rRNA-Synthese enthält.

Die Hybridisierung der Genbibliothek erfolgte daher zunächst nicht mit HeLa snPI RNA, da die Menge an radioaktiv markierter RNA, die für den ersten Hybridisierungsschritt benötigt wurde, nur mit einem verhältnismäßig hohen Aufwand zu isolieren gewesen wäre. Statt dessen ließ sich 18S rRNA verwenden, deren komplementäre DNA-Sequenzen nur 4 kb vom Transkriptionsstartpunkt der 45S rRNA entfernt liegen. Da die Einschübe an menschlicher DNA in die Phagen der Genbank in einem Größenbereich von 15-20 kb liegen (vergleiche 2.4.), ist die Wahrscheinlichkeit hoch, daß ein 18S rRNA-Klon auch die Initiationsregion der 45S rRNA und damit ebenfalls snPI RNA-Sequenzen trägt.

HeLa-Zellen wurden für 36 Stunden mit ^{32}P -Orthophosphat markiert. Die Zytoplasmafraktion wurde phenolextrahiert und poly(A⁺)-RNA über eine oligo(dT)-Säule abgetrennt. Die verbliebene poly(A⁻)-RNA ließ sich durch eine Sucrose-gradienten-Zentrifugation auftrennen (139000xg, 14 Stunden, 25°C, SW 40-Rotor). Der 18S-Bereich wurde gesammelt und die RNA in Hybridisierungslösung aufgenommen. Die nachfolgende Hybridisierung mit 18S rRNA (50000 cpm/ml) erstreckte sich bei 42°C über einen Zeitraum von 64 Stunden. Es kamen Nitrozellulosefilter von 12 Platten (jeweils ca. 7500 Plaques pro Platte) zum Einsatz. Nach dem Waschen der Filter schloß sich eine Autoradiographie an.

Auf den entwickelten Röntgenfilmen zeigten nahezu alle Plaques ein positives Signal. Dies mußte ein Artefakt sein, da 18S rRNA-Gene nur einen kleinen Bruchteil der gesamten menschlichen Gene repräsentieren.

Eine Erklärung wäre, daß 18S rRNA unter den Hybridisierungsbedingungen aufgrund ihres hohen GC-Gehalts (ca. 60%) bereits mit relativ kleinen GC-Bereichen hybridisiert, die überall im Genom vorkommen. Diese unspezifische Bindung an kleine GC-Stücke kann durch eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur unterdrückt werden; hingegen wird die Hybridisierung der 18S rRNA nicht verhindert.

Für eine Hybridisierung bei erhöhter Temperatur wurden die 160 Plaques ausgewählt, welche nach der Hybridisierung bei 42°C (s.o.) die stärksten Signale auf den Röntgenfilmen zeigten. Diese Klone enthalten möglicherweise 18S rRNA-Sequenzen. Die ausgestochenen 160 Plaques wurden vereinigt und in 4 ml Phagenpuffer suspendiert. Aus der Phagensuspension wurden sechs unterschiedliche Verdünnungen hergestellt, die auf jeweils zwei Agarplatten ausplattiert wurden. Dies führte zu Plaquezahlen, die zwischen 12500 und 500 Plaques/Platte lagen. Die von den Platten abgezogenen Nitrozellulosefilter wurden mit 18S rRNA (50000 cpm/ml) bei 60°C für 18 Stunden hybridisiert. Auf das Waschen der Filter folgte eine Autoradiographie.

Die nachfolgende Auswertung erbrachte 12 spezifische Signale.

Durch die Erhöhung der Hybridisierungstemperatur ließen sich somit 12 spezifische Klone identifizieren, die mit hoher Sicherheit 18S rRNA-Sequenzen beinhalten. Um festzustellen, ob diese Klone auch snPI RNA-Sequenzen tragen, mußten die λ -Klone mit snPI RNA hybridisiert werden.

3.3.2. Identifizierung von snPI RNA-Klonen:

Die aus der 60°C-Hybridisierung identifizierten 12 Klone (s.o.) wurden ausgestochen und jeweils in 1 ml Phagenpuffer aufgenommen. Die Phagensuspensionen wurden jeweils 1:20000 verdünnt und auf Agarplatten ausplattiert, was 500-1000 Plaques pro Platte ergab. Von einem Viertel jeder Platte waren jeweils zwei Abzüge herzustellen und die Nitrozellulosefilter für die Hybridisierung vorzubereiten. Die Hybridisierung der Viertelfilter erfolgte bei 42°C für 40 Stunden mit markierter HeLa snPI RNA (10000 cpm/ml),

die mit isolierten Zellkernen in Gegenwart von 200 µg/ml α-Amanitin synthetisiert wurde (Die Zellen wurden mit 0.040 µg/ml Actinomycin D vorbehandelt). Die sich anschließende Behandlung der Filter folgte dem in Abschnitt 2.4.1.2. beschriebenen Verfahren.

Auf dem entwickelten Röntgenfilm zeigte ein Klon deutliche Signale. Alle Plaques der entsprechenden Region auf der Agarplatte waren positiv. Es wurden fünf Plaques dieses Klons, die als λHR,a; λHR,b; λHR,c; λHR,d und λHR,e bezeichnet wurden, ausgestochen und bei 4°C in Phagenpuffer aufbewahrt.

3.4. Charakterisierung des snPI RNA-Klons λHR,a:

Für die Charakterisierung des isolierten snPI RNA-Klons λHR,a wurden die Phagen des Plaques amplifiziert und die entsprechende Phagen-DNA, wie in Abschnitt 2.4.2. beschrieben, isoliert. Die λ-DNA ließ sich mit der Restriktionsendonuklease Eco RI verdauen und in einem 0.8%igen Agarosegel auftrennen (Mit Hilfe von Eco RI ist es möglich, die in die λ-DNA eingebauten menschlichen DNA-Fragmente herauszuschneiden, da die Fremd-DNA über sogenannte Eco RI-"linker" mit der λ-DNA verbunden ist; 29,30). Neben den beiden λ-Armen (11 und 19 kb) sind zusätzlich drei Fragmente (4.3 kb, 6.0 kb und 6.6 kb) zu erkennen, die von der eingeschobenen eukaryotischen DNA stammen (Abb.6,2 und Abb.7,2). Dies zeigt, daß das insertierte menschliche DNA-Fragment zusätzlich zwei interne Eco RI-Schnittstellen besitzt. Außerdem tritt oberhalb der 19 kb λ-Bande eine weitere Bande auf, bei der es sich um ein Aggregat aus den beiden λ-Armen handelt. Die DNA-Fragmente wurden auf Nitrozellulosepapier transferiert und der entsprechende "Southern-Blot" mit HeLa snPI RNA hybridisiert. Diese niedermolekularen RNAs binden ausschließlich an das 6.0 kb Eco RI-Fragment (Abb.6,3).

Bei der Hybridisierung dieses "Blots" mit verschiedenen hochmolekularen ribosomalen RNAs (18S rRNA, 28S rRNA und 45S rRNA) erhielt man das in Abb.7. gezeigte Ergebnis. Danach binden alle ribosomalen RNA-Moleküle über Wasser-

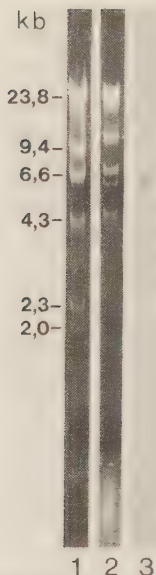


Abb.6: Auftrennung von Restriktionsfragmenten des λ HR,a-Klons in einem 0.8%igen Agarosegel und Hybridisierung mit HeLa snPI RNA

- 1) Marker (Restriktionsfragmente bekannter Größe, die durch Verdauung von λ -DNA mit Hind III erzeugt wurden.
- 2) Elektrophoretische Analyse der Eco RI-Restriktionsfragmente des λ HR,a-Klons.
- 3) Autoradiogramm des "Southern-Blots" von 2) nach Hybridisierung mit in vitro transkribierter und ^{32}P -markierter snPI RNA.

stoffbrücken an das 4.3 kb-Fragment (Abb.7: 3,4,5), während nur 18S rRNA (Abb.7,3) und 45SrRNA (Abb.7,5) an das 6.0 kb-Fragment hybridisieren. Das 6.6 kb Eco RI-Fragment trägt keine DNA-Sequenzen, die komplementär zu den drei ribosomalen RNAs sind.

Aus diesem Hybridisierungsmuster läßt sich, unter Heranziehung der bekannten Eco RI-Schnittstellen in menschlicher rDNA (44), die in Abb.8. dargestellte Struktur für den λ HR,a-Klon ableiten. Der isolierte Klon enthält etwa 17 kb der menschlichen ribosomalen DNA, wobei sowohl der größte Teil der 45S rRNA-Transkriptionseinheit als auch 5'-benachbarte, sogenannte nicht codierende "spacer"-Sequenzen, vorhanden sind. Der Anteil des 45S rRNA-Gens umfaßt - ausgehend von dem Initiationspunkt - den gesamten externen transkribierten "spacer" (ETS), das 18S rRNA-Gen, den sogenannten internen transkribierten "spacer" (ITS), in dem das Gen der 5.8S rRNA liegt, und etwa zwei Drittel des 28S rRNA-Gens.

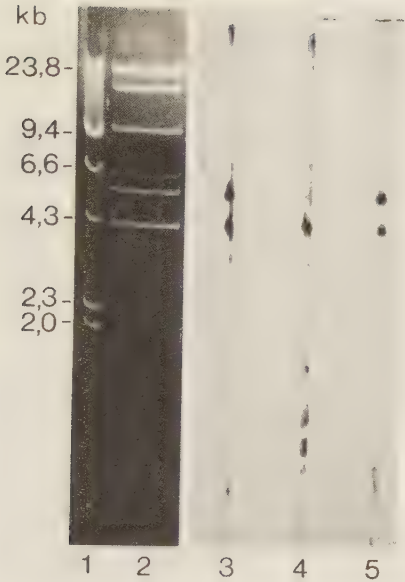


Abb.7: Elektrophoretische Analyse (0.8% Agarosegel) des mit Eco RI verdauten λ HR,a-Klons und Hybridisierung mit hochmolekularer ribosomaler RNA

- 1) Elektrophoretische Auftrennung der Hind III-Fragmente von λ -DNA.
- 2) Verdauungsmuster von λ HR,a-DNA nach Restriktion mit Eco RI.
- 3) Hybridisierung von ^{32}P -markierter 18S rRNA an einen schmalen Streifen des "Blots" von 2).
- 4) Wie 3), aber die Hybridisierung erfolgte mit 28S rRNA.
- 5) Wie 3), jedoch erfolgte die Hybridisierung mit 45S rRNA.

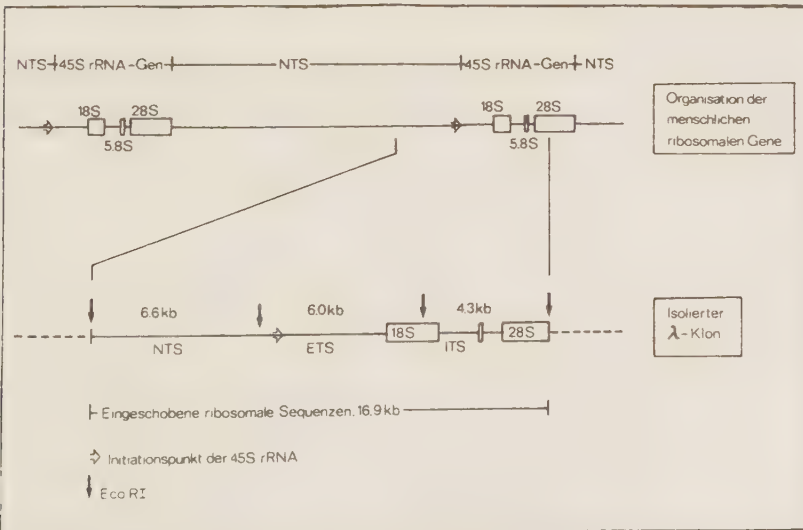


Abb.8: Genkarte der menschlichen rDNA

Tandem-Anordnung der menschlichen ribosomalen Gene (44) und Struktur des isolierten λ HR,a-Klons. Nur die ribosomale Insertion des λ HR,a-Klons ist dargestellt. Der anschließende λ -Vektor wird durch die gestrichelten Linien angedeutet.

SnPI RNA bindet erwartungsgemäß an dasjenige Fragment, welches den Startpunkt der ribosomalen Transkription enthält (6.0 kb-Fragment).

3.5. Konstruktion von Subklonen:

Für die genaueren Untersuchungen zur Lokalisation der snPI RNA-Gene ist es notwendig mit Klonen zu arbeiten, in denen die den relativ kleinen snPI RNAs entsprechenden DNA-Sequenzen stark angereichert sind. Aus diesem Grunde wurden aus dem λ -Klon Subklone erstellt. In einem ersten Schritt wurde das 6.0 kb Eco RI-Fragment (vergleiche Abb.8.) subkloniert.

Das 6.0 kb Eco RI-Fragment wurde aus einem Agarosegel eluiert und mit dem M13-Derivat pUC 8 (35) als Vektor (phosphatase-behandelt und mit Eco RI linearisiert) verbunden. Die resultierende rekombinierte DNA (pEco,6.0) wurde im E.Coli-Stamm JM 103 amplifiziert, die isolierte Plasmid-DNA mit Eco RI geschnitten und die freigesetzten Fragmente in einem 1.2%igen Agarosegel analysiert (Abb.9.).

Das in Abb.9,2 dargestellte Agarosegel belegt, daß der 2.7 kb große Vektor mit einem etwa 6000 bp langen Eco RI-Stück ligiert wurde. Abb.9,5 zeigt das Autoradiogramm des dazugehörigen "Southern-Blots" nach der Hybridisierung mit HeLa snPI RNA. Es ist deutlich zu sehen, daß nur das 6.0 kb Eco RI-Fragment HeLa snPI RNA-Sequenzen trägt.

In einem weiteren Schritt wurde dieser pEco,6.0-Subklon wieder in kleinere Fragmente zerlegt. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Sal I verdaut und die Restriktionsfragmente in einem 1.2%igen Agarosegel aufgetrennt. Dabei traten zusätzlich zum pUC 8-Vektor (2.7 kb) drei weitere Fragmente (1.2 kb, 2.3 kb und 2.4 kb) auf, die vom 6.0 kb Eco RI-Stück herrühren und mit den in der Literatur beschriebenen Größen übereinstimmen (Abb.9,3 und Abb.10.). Das kleinste der erzeugten Fragmente (1.2 kb Eco RI/Sal I) besitzt den 45S rRNA-Startpunkt und besteht aus nicht transkribiertem "spacer" und dem 5'-Ende des externen transkribierten "spacers". Das sich anschließende 2.4 kb-Fragment repräsentiert ausschließlich ETS-Sequenzen,

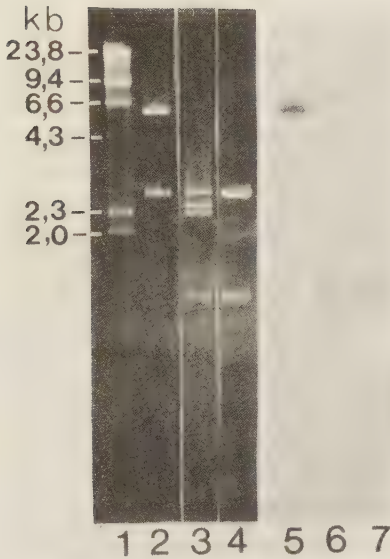


Abb.9: Restriktionsanalysen von Subklonen und Hybridisierung der Restriktionsfragmente mit HeLa snPI RNA (1.2% Agarosegel)

- 1) Gelanalyse der Hind III-Fragmente von λ -DNA (Größenstandard).
- 2) Analyse des pEco,6.0-Subklons nach Verdauung mit Eco RI.
- 3) Restriktionsfragmente der pEco,6.0-DNA nach einer Doppelverdauung mit Eco RI und Sal I.
- 4) pEco/Sal,1.2-DNA nach der Restriktionsverdauung mit Eco RI und Sal I.
- 5) Autoradiogramm des "Blots" von 2) nach Hybridisierung mit HeLa snPI RNA.
- 6) Autoradiogramm des "Blots" von 3) nach Hybridisierung mit HeLa snPI RNA.
- 7) Hybridisierung von HeLa snPI RNA an die transferierten Restriktionsfragmente von 4).

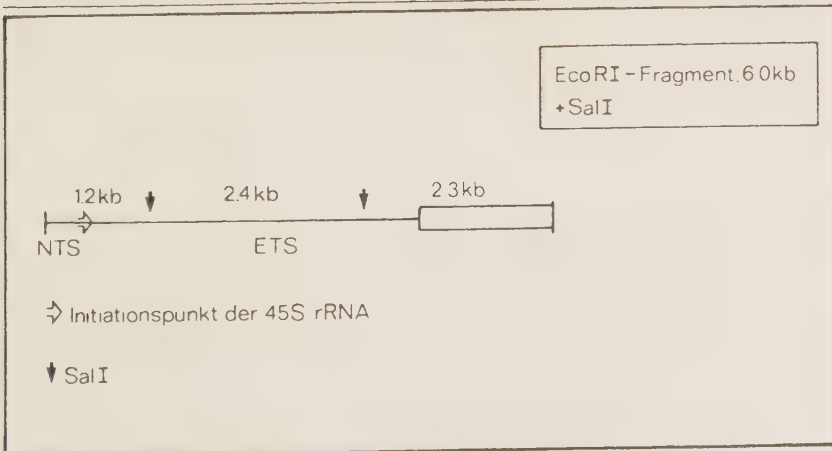


Abb.10: Restriktionskarte des 6.0 kb Eco RI-Fragments

Anordnung der Sal I-Restriktionsstellen im 6.0 kb Eco RI-Fragment aus Abb.8. (vergleiche Referenz 57). Der offene Balken repräsentiert 18S rRNA-Sequenzen.

während das 2.3 kb-Fragment zusätzlich einen Teil des 18S rRNA-Gens trägt. Nach dem Transfer dieser DNA-Fragmente auf Nitrozellulosepapier schloß sich eine Hybridisierung mit HeLa snPI RNA an. Das Hybridisierungsmuster des entsprechenden "Southern-Blots" verdeutlicht, daß HeLa snPI RNA ausschließlich an das 1.2 kb Eco RI/Sal I-Fragment bindet (vergleiche Abb.9,6).

Das isolierte 1.2 kb Eco RI/Sal I-Fragment wurde wiederum mit phosphatasebehandeltem pUC 8, der vorher mit Eco RI und Sal I restringiert worden war, ligiert. Zur Prüfung der Ligation wurde der Subklon (pEco/Sal,1.2) mit Eco RI und Sal I wieder zerlegt, die Fragmente in einem Agarosegel elektrophoriert (Abb.9,4) und nach dem Transfer auf Nitrozellulosepapier mit HeLa snPI RNA hybridisiert. Abb.9,4 macht deutlich, daß in den Vektor dasjenige 1.2 kb große Eco RI/Sal I-Fragment eingebaut wurde, welches auch im pEco,6.0-Subklon auftritt (vergleiche Abb.9,3). Wie zuvor zeigt dieses Subfragment deutliche Hybridisierung mit HeLa snPI RNA (Abb.9,7).

Aus den bisher erwähnten Ergebnissen folgt, daß HeLa snPI RNA-Sequenzen innerhalb des anfänglich isolierten λ HR,a-Klons (vergleiche Abb.8.) ausschließlich in einem 1.2 kb großen Eco RI/Sal I-Fragment liegen (Abb.9,7). Dieses 1.2 kb Eco RI/Sal I-Fragment schließt erwartungsgemäß den Initiationspunkt der 45S rRNA-Transkription ein (Abb.10.).

Die Größen der HeLa snPI RNAs liegen in einem Bereich von 200-500 Nukleotiden. Das 1.2 kb Eco RI/Sal I-Fragment hat somit eine vernünftige Größe, wobei ein relativ hoher Anteil auf die HeLa snPI RNA-Sequenzen entfällt. Im Vergleich zum λ HR,a-Klon sind die snPI RNA-Gene in dem 1.2 kb-Fragment stark angereichert. Außerdem ist es sehr wahrscheinlich, daß dieser Subklon auch die vor dem Initiationspunkt liegenden, für die Transkription durch RNA-Polymerase I wichtigen, regulatorischen Sequenzen trägt.

Für die nachfolgenden Experimente wurde entweder das Plasmid pEco/Sal,1.2 oder das isolierte 1.2 kb Eco RI/Sal I-Fragment verwendet.

3.6. Einfluß von RNase T₁ auf RNA-DNA-Hybride:

Um zu demonstrieren, daß die Hybride zwischen snPI RNA und dem 1.2 kb Eco RI/Sal I-Fragment nicht auf zufälligen Basenpaarungen beruhen, wurden die Hybride mit RNase T₁ behandelt.

Hierzu wurde HeLa snPI RNA an pEco/Sal, 1.2-DNA hybridisiert, die an Nitrozellulosefilter gebunden war (5 µg Plasmid-DNA/Filter). Nach dem Abwaschen von unspezifisch gebundener RNA folgte eine Ribonukleasebehandlung, wodurch einzelsträngige RNA-Bereiche von unvollständig basengepaarten RNA-DNA-Hybriden hinter Guanosinresten gespalten wurden. Die danach noch fest gebundenen RNAs ließen sich durch einen Hitzeschritt (3 Minuten bei 95°C) abschmelzen und in einem Polyacrylamidgel analysieren (Abb.11,3). Aus dem Vergleich mit dem RNA-Muster in Abb.11,2 (hierbei wurde der RNase T₁-Schritt weggelassen) folgt, daß RNase T₁ keinen Einfluß auf das Spektrum der abgeschmolzenen RNA-Moleküle hat. Dieses RNA-Muster entspricht dem typischen HeLa snPI RNA-Spektrum, das auch z.B. durch in vitro Transkription mit isolierten Zellkernen erhalten wird (vergleiche Abb.11,1).

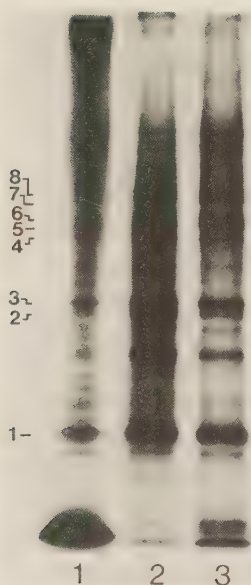
Da das 1.2 kb Eco RI/Sal I-Fragment einen GC-Gehalt von 75% besitzt (57), ist es sehr unwahrscheinlich, daß imperfekte Hybride mit der RNase T₁-Methode nicht erfaßt wurden, und von daher die snPI RNA-Moleküle vollständig homolog zu den entsprechenden DNA-Sequenzen sind.

3.7. Kartierung von HeLa snPI RNA-Molekülen:

Für das Verständnis der nachfolgenden Ergebnisse ist es notwendig, einige Erläuterungen zur frühen Prozessierung der HeLa 45S rRNA zu machen:

Wie bereits erwähnt ist in Maus-Zellen das primäre Transkriptionsprodukt des 45S rRNA-Gens eine kurzlebige Vorstufe, die bald nach ihrer Synthese prozessiert wird und ein ca. 650 Nukleotide langes Stück ihres 5'-Endes verliert. Eine analoge Situation liegt in HeLa-Zellen vor, mit dem Unterschied, daß in diesen Zellen ca. 410 Nukleotide - anstelle von 650 - vom primären Transkript abge-

Abb.11: Autoradiogramm von elektrophoretisch aufgetrennten RNA-Molekülen, die aus RNA-DNA-Hybriden zurückgewonnen wurden (4-10% SDS-Polyacrylamidgel)



- 1) HeLa snPI RNA, die in vitro in isolierten Zellkernen in Gegenwart von 200 µg/ml α -Amanitin synthetisiert wurde nach Vorbehandlung der Zellen mit 0.040 µg/ml Actinomycin D. Die Hauptspezies sind numeriert (1-8). Vergleiche Referenz 18.
- 2) Spektrum von HeLa snPI RNAs, die nach der Hybridisierung an den pEco/Sal, 1.2-Subklon aus den Hybriden abgeschmolzen wurden.
- 3) Wie 2), jedoch wurden die DNA-RNA-Hybride vor dem Abschmelzen mit RNase T₁ (30 Einheiten/ml) inkubiert, um imperfekte Hybride nachzuweisen.

spalten werden. Die 5'-Enden dieser beiden nebeneinander vorliegenden 45S rRNA-Moleküle sind in der Genkarte in Abb.12. angegeben (57).

Zur Lokalisation einzelner snPI RNA-Spezies wurde das 1.2 kb Eco RI/Sal I-Fragment mit der Restriktionsendonuklease Hinf I verdaut, wodurch fünf DNA-Fragmente mit folgenden Längen entstanden: 536 bp, 357 bp, 195 bp, 116 bp und 10 bp (vergleiche Abb.12.). Drei dieser Fragmente repräsentieren ausschließlich NTS-DNA, nämlich das 116 bp-Fragment, 10 bp-Fragment und 357 bp-Fragment. Hingegen besteht das 536 bp Hinf I/Sal I-Fragment nur aus ETS-Sequenzen. Das 195 bp Hinf I-Fragment besitzt DNA-Sequenzen beider "spacer" (30 Nukleotide NTS bzw. 165 Nukleotide ETS); außerdem ist in diesem Fragment der Initiationspunkt der 45S rRNA-Synthese lokalisiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung dieser Restriktionsfragmente (Abb.13,2) wurden diese auf Nitrozellulosepapier transferiert und mit einzel-

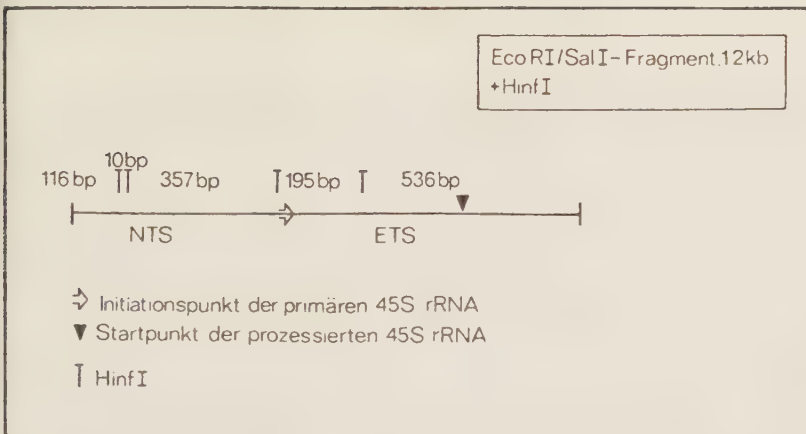


Abb.12: Restriktionskarte des 1.2 kb Eco RI/Sal I-Fragments mit Angabe der Hinf I-Schnittstellen (57)

Die Eco RI-Schnittstelle (vergleiche Abb.10.) ist an der linken Seite des 1.2 kb-Fragments, die Sal I-Schnittstelle an der rechten Seite des Fragments lokalisiert.

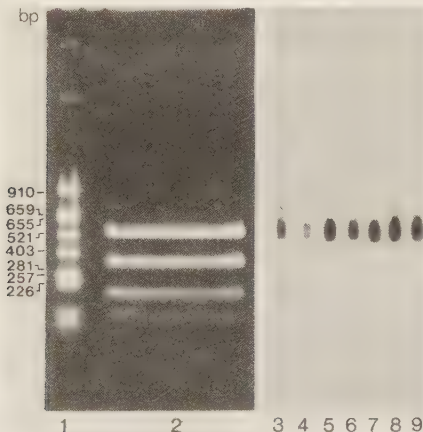


Abb.13: Hybridisierung einzelner HeLa snPI RNA-Spezies an elektrophoretisch analysierte (1.8% Agarosegel) Hinf I-Fragmente der 1.2 kb Eco RI/Sal I-DNA

- 1) Alu I-Restriktionsfragmente von pBR 322 (Marker)
- 2) Elektrophoretische Auftrennung von 1.2 kb Eco RI/Sal I-DNA nach Verdauung mit Hinf I.
- 3) Hybridisierung von HeLa snPI RNA Nr.1 an einen schmalen Streifen des "Blots" von 2).

- 4) "Blot" von 2) nach Hybridisierung mit HeLa snPI RNA Nr.2.
- 5) "Blot" von 2) nach Hybridisierung mit HeLa snPI RNA Nr.3.
- 6) "Blot" von 2) nach Hybridisierung mit HeLa snPI RNA Nr.4.
- 7) "Blot" von 2) nach Hybridisierung mit HeLa snPI RNA Nr.5.
- 8) "Blot" von 2) nach Hybridisierung mit HeLa snPI RNA Nr.6.
- 9) "Blot" von 2) nach Hybridisierung mit HeLa snPI RNA Nr.7.

nen HeLa snPI RNA-Spezies bei 42°C in Hybridisierungslösung inkubiert. Die Autoradiogramme der Nitrozellulosestreifen sind in Abb.13. gezeigt.

Die eingesetzten snPI RNA-Moleküle Nr.2-7 (vergleiche Abb.11.) hybridisieren ausschließlich an das 536 bp große Hinf I/Sal I-Fragment (Abb.13: 4-9). Die einzige Ausnahme bildet die Spezies Nr.1 (vergleiche Abb.11.), die - zusätzlich zum 536 bp-Stück - auch an das 195 bp Hinf I-Fragment bindet (Abb.13,3).

Da das 536 bp große Hinf I/Sal I-Fragment (vergleiche Abb.12.) nur ETS-Sequenzen trägt, liegen die für die HeLa snPI RNA-Spezies 2-7 codierenden Sequenzen im externen transkribierten "spacer". Über die Lokalisation des Gens der HeLa snPI RNA Nr.1 läßt sich noch keine entsprechende Aussage machen, da das 195 bp-Fragment sowohl NTS- als auch ETS-Sequenzen beinhaltet (Abb.12.).

Aufgrund des Befundes, daß die snPI RNAs Nr.2-7, deren Größen in einem Bereich von 300-500 Nukleotiden liegen, alle an die 536 bp große Hinf I/Sal I-DNA binden, schienen die folgenden Annahmen möglich:

- 1) Die HeLa snPI RNAs Nr.2-7 stammen nicht ausschließlich aus dem 410 bp DNA-Stück, durch das sich das primäre ribosomale Transkript von der prozessierten 45S rRNA unterscheidet (vergleiche Abb.12. und Abb.14.).
- 2) Die HeLa snPI RNA-Moleküle 2-7 beginnen alle an einem gemeinsamen Punkt.

Zur experimentellen Untersuchung des ersten Punktes wurde die 1.2 kb Eco RI/Sal I-DNA mit dem Restriktionsenzym Sau 3A gespalten. Dabei wurden vier Restriktionsfragmente erzeugt (Abb.14.): ein 107 bp-Fragment, das nur NTS-Sequenzen trägt, ein 785 bp-Fragment, das den 45S rRNA-Startpunkt beinhaltet, und ein 277 bp großes DNA-Stück, das ausschließlich aus entfernteren ETS-Sequenzen besteht. Weiterhin wird noch ein 45 bp langes Stück gebildet, welches den Startpunkt der prozessierten 45S rRNA einrahmt; dieses Fragment wurde aufgrund seiner geringen Größe bei dieser Gelelektrophorese nicht erfaßt. Die anderen beschriebenen Restriktionsfragmente ließen

sich in einem 1.8%igen Agarosegel auftrennen (Abb.15,2). Die entsprechenden "Blots" wurden wiederum mit HeLa snPI RNA - die gesamte Population wurde verwendet - hybridisiert.

Das Hybridisierungsmuster in Abb.15,1 bestätigt, daß die für snPI RNA codierenden Sequenzen im 785 bp- und 277 bp-Fragment lokalisiert sind und somit über die Prozessierungsstelle der 45S rRNA (▼) hinausgehen (vergleiche Abb.14.).

Zur Verifizierung der zweiten Mutmaßung wurden die erwähnten snPI RNA Spezies (Nr.2-7) getrennt gegen das 785 bp große Sau 3A-Fragment (Abb.14.), das an Nitrozellulosefilter gebunden war, hybridisiert. Die gebildeten RNA-DNA-Hybride wurden anschließend mit RNase T₁ behandelt, wodurch überstehende RNA-Stränge abgeschnitten wurden (die für HeLa snPI RNA codierenden DNA-Sequenzen erstrecken sich teilweise vom 785 bp-Fragment in das 277 bp-Fragment; vergleiche Abb.15.). Die nach der Ribonukleaseverdauung verbliebenen RNA-Moleküle ließen sich aus den Hybriden abschmelzen (vergleiche 2.7.4.) und in einem 8%igen Polyacrylamidgel in Gegenwart von 7 M Harnstoff auftrennen (Abb.16: 3-8).

Das Autoradiogramm des Harnstoffgels macht deutlich, daß bei allen eingesetzten snPI RNA-Spezies (Nr.2-7) ein RNA-Fragment gleicher Größe mit dem Sau 3A-Fragment Basenpaarungen ausbildet. Ein Vergleich mit dem RNA-Längenstandard (Abb.16: 1 und 2) zeigt, daß dieses allen gemeinsame geschützte RNA-Fragment eine Länge von ca. 165 Nukleotiden hat.

Die HeLa snPI RNAs Nr.2-7 haben also alle ein gemeinsames Ende, das an einem Punkt liegt, der ca. 215 Nukleotide vom Transkriptionsstart der 45S rRNA entfernt ist (vergleiche Abb.14., Abb.12. und Referenz 57). Um zu bestimmen, ob dieses gemeinsame Ende jeweils den 5' oder 3'-Terminus der einzelnen snPI RNA-Moleküle darstellt, mußte die Transkriptionsrichtung der snPI RNA bestimmt werden. Dies läßt sich am einfachsten durch die Bestimmung des für die snPI RNA codierenden Strangs der ribosomalen DNA feststellen. Dabei dient der codogene Strang des 45S rRNA-Gens als Referenz.

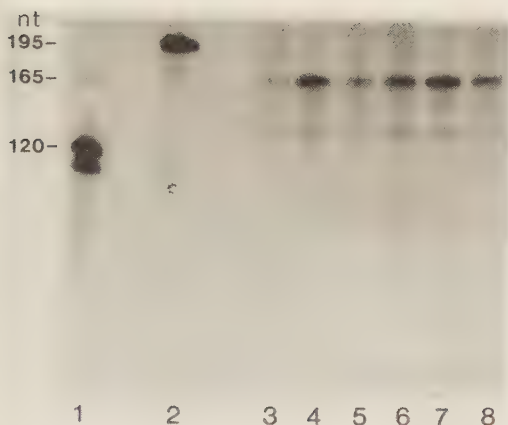


Abb.16: Elektrophoretische Analyse von geschützten RNA-Sequenzen nach RNase T₁-Behandlung (8%iges Polyacrylamidgel in Gegenwart von 7 M Harnstoff)

Einzelne HeLa snPI RNAs wurden an das 785 bp lange Sau 3A-Fragment (Abb.14.) hybridisiert, die Hybride mit RNase T₁ (30 Einheiten/ml) inkubiert, die verbliebenen RNA-Moleküle zurückgewonnen und in Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

- 1) Marker: 5S rRNA (120 Nukleotide).
- 2) Marker: U₂ RNA (195 Nukleotide).
- 3) Geschütztes RNA-Fragment der HeLa snPI RNA Nr.2
- 4) Geschütztes RNA-Fragment der HeLa snPI RNA Nr.3
- 5) Geschütztes RNA-Fragment der HeLa snPI RNA Nr.4
- 6) Geschütztes RNA-Fragment der HeLa snPI RNA Nr.5
- 7) Geschütztes RNA-Fragment der HeLa snPI RNA Nr.6
- 8) Geschütztes RNA-Fragment der HeLa snPI RNA Nr.7

3.8. Bestimmung des codogenen DNA-Strangs:

Einzelne DNA-Stränge lassen sich mit Hilfe des Enzyms Exonuklease III aus linearer doppelsträngiger DNA erzeugen (vergleiche Abschnitt 2.8.).

Das Plasmid pEco/Sal,1.2 wurde zunächst mit der Restriktionsendonuklease Pst I linearisiert. Die Pst I-Schnittstelle ist innerhalb des pUC 8- Vektors nur wenige Nukleotide von der Sal I-Schnittstelle entfernt lokalisiert (35). Die Anordnung der 3' und 5'-Enden im Pst I-verdauten pEco/Sal,1.2-Subklon ist in Abb.17. dargestellt. Durch eine Inkubation des linearisierten Plasmids mit Exonuklease III wurden zwei DNA-Einzelstränge erzeugt, von denen jeder ungefähr halb so lang ist wie die ursprüngliche Doppelstrang-DNA. Dabei bleibt der codogene Strang der ribosomalen DNA erhalten. Außer den beiden Einzelsträngen bildet sich noch ein drittes Produkt, bei dem diese beiden Einzelstränge an ihren 3'-Enden über einen kleinen Bereich durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten werden (vergleiche Abb.17.).

Die elektrophoretische Auftrennung dieser drei Produkte ist in Abb. 18,2 gezeigt. Bei der Bande, die bei ca. 3.9 kb liegt, handelt es sich um nicht abgebaute lineare pEco/Sal, 1.2-DNA. Weiterhin ist in dem Agarosegel noch eine weitere Einzelbande sichtbar, vor der eine DNA-Doppelbande wandert. Diese DNA-Doppelbande repräsentiert die beiden durch Exonuklease III erzeugten Einzelstränge, während die darüberliegende DNA-Einzelbande die beiden teilweise durch Basenpaarung zusammengehaltenen Einzelstränge darstellt. Diese analysierten DNA-Banden wurden auf Nitrozellulosepapier transferiert und mit HeLa 45S rRNA und HeLa snPI RNA (gesamte Population) hybridisiert. Die entsprechenden Autoradiogramme der "Southern-Blots" sind in Abb.18,3 bzw. Abb. 18,4 wiedergegeben.

HeLa 45S rRNA hybridisiert erwartungsgemäß an einen der beiden DNA-Einzelstränge und an das teilweise doppelsträngige Produkt, da diese beiden DNA-Moleküle den codogenen Strang besitzen (Abb. 18,3). SnPI RNA zeigt das gleiche Hybridisierungsmuster (Abb.18,4). Daraus folgt, daß snPI RNA an den gleichen DNA-Strang wie 45S rRNA hybridisiert.

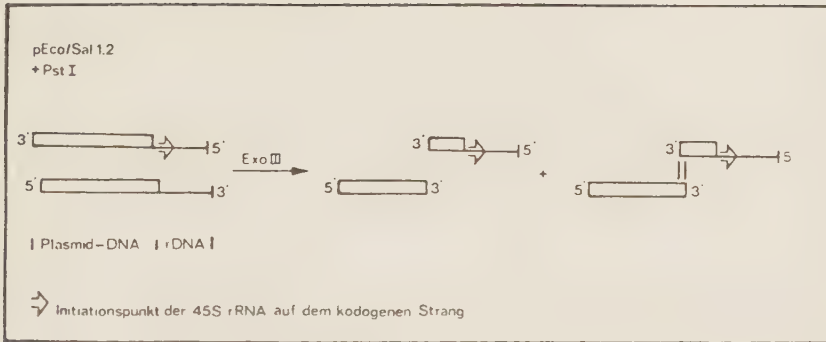


Abb.17: Schematische Darstellung der Einwirkung von Exonuklease III auf das mit Pst I linearisierte pEco/Sal,1.2-Plasmid

Der codogene Strang wird durch die Exonuklease III-Behandlung nicht abgebaut. Neben den beiden DNA-Einzelsträngen tritt ein zusätzliches, drittes Produkt auf, bei dem die beiden Einzelstränge über Wasserstoffbrückenbindungen an ihren 3'-Enden über einen kurzen Bereich miteinander verbunden bleiben. Die Gelanalyse dieser drei Produkte ist in Abb.18,2 dargestellt.

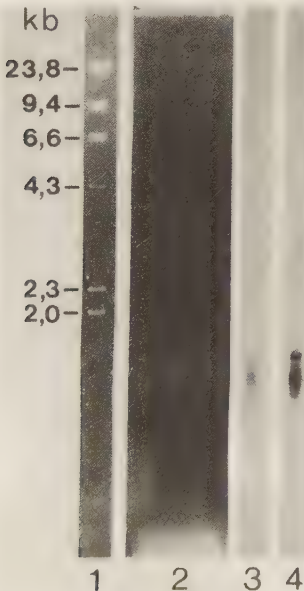


Abb.18: Hybridisierung von HeLa snPI RNA und HeLa 45S rRNA an elektrophoretisch analysierte (1.2% Agarosegel) DNA-Einzelstränge

- 1) Marker: Hind III-Fragmente von λ -DNA.
- 2) Gelelektrophorese des pEco/Sal,1.2-Plasmids nach Verdauung mit Pst I und Exonuklease III (vergleiche Abb.17.).
- 3) Hybridisierung von HeLa 45S rRNA an den "Southern-Blot" von 2).
- 4) Hybridisierung von HeLa snPI RNA an die transferierten DNA-Fragmente von 2).

Für das Kontrollexperiment wurde das pEco/Sal,1.2-Plasmid vor der Exonuklease III-Behandlung mit dem Restriktionsenzym Eco RI linearisiert. Dabei wurde das Plasmid auf der anderen Seite der rDNA geöffnet und deshalb führte die Exonuklease III-Verdauung in diesem Fall zum Abbau des codogenen Strangs (vergleiche Abb.19.). Die gebildeten DNA-Moleküle wurden wiederum in einem Agarosegel analysiert (Abb.20,2) und die entsprechenden "Southern-Blots" ebenfalls mit 45S rRNA (Abb.20,3) und snPI RNA (Abb.20,4) hybridisiert. Auf den Autoradiogrammen der "Blots" ist in beiden Fällen keine Hybridisierung nachweisbar. Die verbliebenen DNA-Einzelstränge besitzen keine Sequenzen, die komplementär zu den eingesetzten Ribonukleinsäuren sind.

Da alle snPI RNAs vom gleichen Strang wie die 45S rRNA transkribiert werden, ergibt sich, daß die Synthese der niedermolekularen snPI RNAs in der gleichen Richtung wie die Transkription der ribosomalen RNA erfolgen muß. Da diese Hybridisierungsexperimente mit der gesamten snPI RNA-Population durchgeführt wurden und überhaupt keine Hybridisierung an den nicht codogenen Strang des 45S rRNA-Gens zu beobachten ist, bedeutet dies weiterhin, daß auch die snPI RNA Nr.1 in der gleichen Richtung transkribiert wird. In Beziehung zu den in Abb.13. dargestellten Ergebnissen folgt daraus, daß das 5'-Ende der snPI RNA Nr.1 in dem 195 bp-Fragment liegt, während das 3'-Ende dieser RNA im 536 bp-Fragment zu finden sein muß (vergleiche Abb.12.).

3.9. 5'-Ende der HeLa snPI RNA Nr.1:

Das 5'-Ende der snPI RNA-Moleküle Nr.2-7 ist ca. 215 Nukleotide vom Initiationspunkt der 45S rRNA entfernt. Dieser Abstand entspricht der Größe der snPI-Spezies 1, deren komplementären DNA-Sequenzen im 195 bp Hinf I-Fragment und 536 bp Hinf I/Sal I-Fragment lokalisiert sind (Abb.13. und Abb.12.). Diese Daten legen die Schlußfolgerung nahe, daß die snPI RNA Nr.1 die gleiche Initiationsstelle wie die 45S rRNA besitzt.

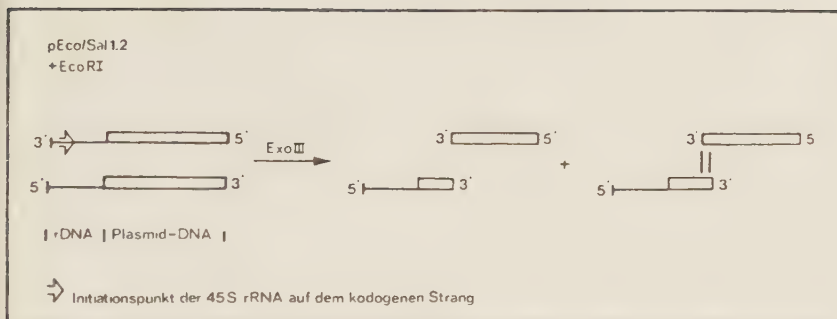


Abb.19: Verdauungsmuster von Exonuklease III nach Restriktion des pEco/Sal,1.2-Plasmids mit Eco RI

Aufgrund der Linearisierung des Plasmids mit Eco RI führt die Exonuklease III-Behandlung zum Abbau des codogenen Strangs (vergleiche Abb.17.). Die elektrophoretische Analyse der gezeigten Produkte ist in Abb.20,2 dargestellt.

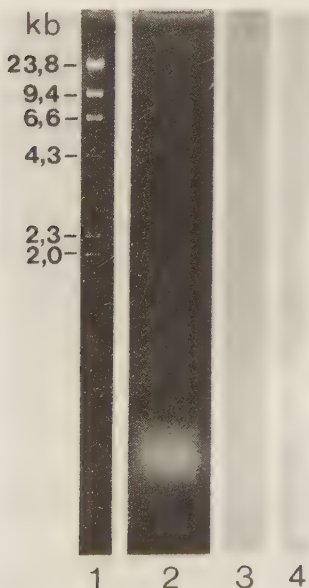


Abb.20: Auftrennung von DNA-Einzelsträngen in einem 1.2%igen Agarosegel und Hybridisierung der transferierten DNA-Fragmente mit HeLa snPI RNA und HeLa 45S rRNA

- 1) λ -Marker nach Verdauung mit Hind III.
- 2) Elektrophoretische Analyse der DNA-Produkte, die nach Exonuklease III-Behandlung des Eco RI-verdauten pEco/Sal,1.2-Plasmids entstehen.
- 3) Hybridisierung von HeLa 45S rRNA an die DNA-Fragmente von 2).
- 4) Hybridisierung von HeLa snPI RNA an die DNA-Fragmente von 2).

Für die exakte Lokalisation des 5'-Endes der 215 Nukleotide langen snPI RNA Nr.1 innerhalb des 195 bp Hinf I-Fragments (Abb.12.) wurde deshalb die für die Bestimmung des Startpunktes der snPI RNA-Spezies Nr.2-7 bereits beschriebene Technik angewendet (vergleiche Abschnitt 3.7.). Das im Hybrid gegen RNase T₁-Verdauung geschützte Fragment der snPI RNA Nr.1 hat eine Länge von ca. 170 Nukleotiden (vergleiche Abb.21.). Zusätzlich tritt eine wesentlich schwächere Bande von ca. 215 Nukleotiden auf, die wahrscheinlich ungeschnittene HeLa snPI RNA Nr.1 repräsentiert.

Zusammen mit der Strangselektivität deutet dieses Ergebnis darauf hin, daß das snPI RNA-Molekül Nr.1 an der gleichen Stelle wie die 45S rRNA beginnt, da die Hinf I-Schnittstelle zwischen dem 195 bp-Fragment und dem 536 bp großen Fragment der Abb.12. 170 Nukleotide von der Initiationsstelle der 45S rRNA entfernt ist (vergleiche Referenz 57).

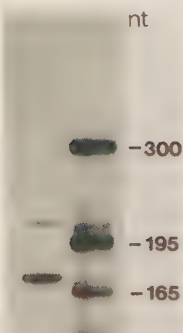


Abb.21: Bestimmung des 5'-Endes der HeLa snPI RNA Nr.1

Die HeLa snPI RNA-Spezies 1 wurde an das 195 bp große Hinf I-Fragment (Abb.12.) hybridisiert. Nach T₁-Ribonukleasebehandlung wurde das geschützte RNA-Fragment aus dem Hybrid abgeschmolzen und in einem 8%igem Polyacrylamidgel, das 7 M Harnstoff enthielt, aufgetrennt.

- 1) Analyse des RNase T₁-resistenten RNA-Fragments der HeLa snPI RNA-Spezies 1.
- 2) RNA-Längenstandard: U₁ RNA (165 Nukleotide), U₂ RNA (195 Nukleotide) und scK RNA (300 Nukleotide).

Die Anordnung aller untersuchten HeLa snPI RNA-Spezies innerhalb des 1.2 kb Eco RI/Sal I-Fragments ist in der schematischen Abb.22. zusammenfassend dargestellt. Danach sind alle snPI RNA-Moleküle innerhalb des externen transkribierten "spacers" lokalisiert; sie gehören also zur 45S rRNA-Transkriptionseinheit. Die snPI RNA Nr.1 initiiert mit sehr großer Wahrscheinlichkeit am gleichen Punkt wie die ribosomale Vorläufer-RNA (45S rRNA). Die Position des 3'-Endes der snPI RNA-Spezies 1 stimmt sehr wahrscheinlich mit dem Ort der 5'-Enden der snPI RNAs Nr.2-7 überein. Diese RNA-Enden sind ca. 215 Nukleotide vom Startpunkt der ribosomalen Transkription entfernt. Da die snPI RNA-Moleküle Nr.2-7 teilweise über die mit ▼ bezeichnete Prozessierungsstelle der 45S rRNA hinauslaufen, stellen sie kein Produkt des entsprechenden Prozessierungsvorganges dar (vergleiche 57). Es ist anzunehmen, daß die snPI RNAs durch ein bisher nicht beobachtetes Prozessierungssystem entstehen.

In einem zweiten Teil der Untersuchungen wurden Experimente zur Biosynthese der snPI RNAs durchgeführt. Diese Untersuchungen beinhalteten Studien zur in vitro Transkription mit den klonierten snPI RNA-Genen.

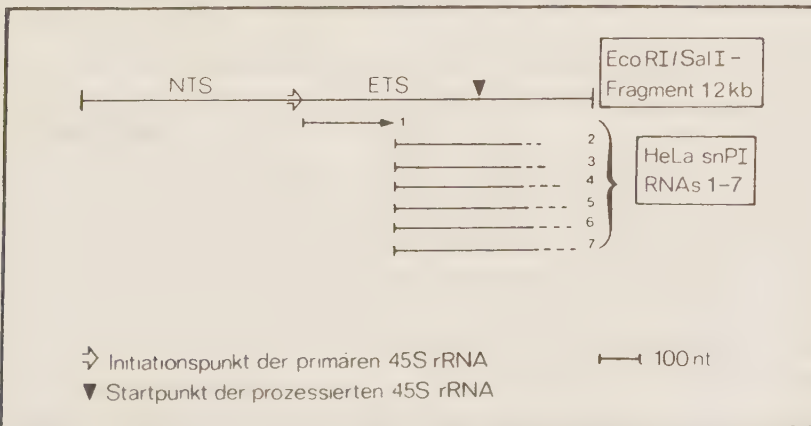


Abb.22: Schematische Lokalisation der HeLa snPI RNA-Sequenzen 1-7 innerhalb des 1.2 kb Eco RI/Sal I-Fragments der ribosomalen DNA. Die Transkriptionsrichtung ist von links nach rechts dargestellt. Die 3'-Enden der snPI RNA-Moleküle 2-7 sind gestrichelt dargestellt, da ihre genaueren Positionen nicht bekannt sind.

3.10. In vitro Transkription mit isolierten, klonierten Genen:

3.10.1. In vitro RNA-Synthese mit rDNA-haltigen Plasmiden:

Für das Studium der Transkription von eukaryotischen Genen erwiesen sich auch solche in vitro Systeme als erfolgreich, bei denen klonierte Gene als Matrizen für die RNA-Synthese in zellfreien Extrakten dienten (27,58,59). Es bestanden somit gute Aussichten mit Hilfe des Subklons pEco/Sal,1.2 ein in vitro Transkriptionssystem für die Untersuchung der snPI RNA-Synthese zu etablieren.

Die Transkription von ribosomalen Klonen, die den Initiationspunkt der 45S rRNA enthalten, wurde von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (26,55,56). Die Transkription eines ribosomalen Maus-Klons in seiner zirkulären Form mit einem zytoplasmatischen Extrakt führt zur Synthese von mehreren hochmolekularen RNA-Molekülen, jedoch nicht zu solchen, die im Größenbereich der snPI RNA-Moleküle liegen (59).

Vergleichbare Ergebnisse erhält man bei der in vitro Transkription des zirkulären pEco/Sal,1.2-Subklons mit einem zytoplasmatischen Extrakt.

In Abb.23. ist die elektrophoretische Analyse der RNA-Produkte gezeigt, die durch in vitro Transkriptionen mit einem Extrakt aus ganzen Zellen (Abb.23: 2-5) oder einem Zytoplasma-Extrakt (Abb.23: 6-9) erhalten wurden. Zum Vergleich zeigt Abb.23,1 die Transkripte, die durch in vitro RNA-Synthese mit isolierten Zellkernen aus HeLa-Zellen nach Vorbehandlung mit Actinomycin D synthetisiert wurden.

Alle Ansätze enthielten 200 µg/ml α -Amanitin; bei dieser Inhibitorkonzentration werden die RNA-Polymerasen II und III inaktiviert. Deshalb wurden nur RNA-Polymerase I-Produkte erhalten. Für diese Experimente zur RNA-Synthese mit Hilfe von löslichen Zellextrakten kamen verschiedene DNA-Matrizen zum Einsatz.

Zunächst sollen die mit einem zytoplasmatischen Extrakt ausgeführten Versuche beschrieben werden:

Das Ergebnis der in vitro Transkription ohne exogen zugesetzte DNA (Kontrollreaktion) ist in Abb.23,9 dargestellt. Der Extrakt selbst ist für die Erzeugung dieser Produkte verantwortlich; wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine Matrizen-unabhängige Transferase-Addition.

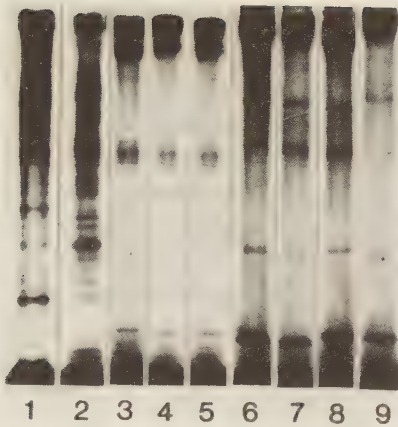


Abb.23: Gelelektrophoretische Analyse von RNA-Molekülen, die sich durch in vitro Transkription isolierter Gensequenzen mit löslichen Zellextrakten synthetisieren ließen (4-10% SDS-Polyacrylamidgel)

Alle RNA-Syntheseansätze enthielten 200 µg/ml α -Amanitin.

Für die Transkriptionsexperimente mit löslichen Zellextrakten wurden verschiedene DNA-Matrizen eingesetzt.

- 1) Zum Vergleich HeLa snPI RNAs, die in vitro in isolierten Zellkernen transkribiert wurden (der Zellkernisolierung ging eine Actinomycin D-Behandlung (0.040 µg/ml) voraus).
- A) Transkriptionsexperimente unter Verwendung eines Manley-Extrakts (aus ganzen Zellen präpariert):
 - 2) RNA-Synthese mit dem zirkulären pEco/Sal,1.2-Plasmid als Matrize.
 - 3) Wie 2), jedoch in Gegenwart von 200 µg/ml Actinomycin D.
 - 4) Transkription mit dem zirkulären pUC 8-Plasmid (ohne rDNA-Insertion).
 - 5) In vitro Transkription ohne exogen zugesetzte DNA (Kontrolle).
- B) Transkriptionsexperimente mit einem zytoplasmatischen Extrakt:
 - 6) RNA-Transkripte unter Verwendung des zirkulären pEco/Sal,1.2-Plasmids.
 - 7) Wie 6), allerdings mit 200 µg/ml Actinomycin D im Ansatz.
 - 8) Transkriptionsprodukte des zirkulären pUC 8-Plasmids (wie 4).
 - 9) Kontrollreaktion: RNA-Synthese ohne exogen zugesetzte DNA.

Bei der Verwendung des zirkulären pUC 8 -Plasmids als DNA-Matrize (Abb.23,8) traten keine zusätzlichen Produkte auf, d.h., dieses zirkuläre Plasmid wird nicht von RNA-Polymerase I transkribiert.

Die in vitro RNA-Synthese in Gegenwart des zirkulären pEco/Sal,1.2-Subklons führte jedoch zu einer Vielzahl hochmolekularer RNA-Moleküle, die durch den Schmier im oberen Bereich des Gels repräsentiert werden (Abb.23,6). Aus einem Vergleich mit der Kontrollreaktion (Abb.23,9) und der pUC 8 -Transkription (Abb.23,8) folgt, daß die ribosomale Insertion des pEco/Sal,1.2-Plasmids die Synthese dieser hochmolekularen RNAs codieren muß. Der pEco/Sal,1.2-Subklon besteht ja wie beschrieben aus dem ribosomalen 1.2 kb Eco RI/ Sal I-Fragment und dem Plasmid-Vektor pUC 8 .

Die Erzeugung dieser RNA-Moleküle läßt sich vollständig durch hohe Konzentrationen von Actinomycin D (200 µg/ml) unterdrücken (Abb.23,7). Actinomycin D interkaliert in doppelsträngige DNA zwischen GC-Paare und verhindert damit die Verwendung der DNA als Matrize (60). Die Synthese der hochmolekularen RNAs in Abb.23,6 beruht daher auf einer Matrizen-abhängigen Reaktion.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß diese in Abb.23,6 dargestellten hochmolekularen RNAs RNA-Polymerase I-Produkte sind (ihre Synthese ist resistent gegen 200 µg/ml α -Amanitin), deren Synthese von der Anwesenheit der menschlichen rDNA abhängt. Die wenigen niedermolekularen Banden, die bereits in der Kontrolle vorhanden sind, repräsentieren Produkte des zytoplasmatischen Extrakts (vergleiche Abb.23,9).

Ein vollkommen anderes Resultat ergab sich bei der Verwendung eines löslichen Extrakts, der aus ganzen Zellen präpariert wurde (Manley-Extrakt):

Die in vitro Transkription des zirkulären pEco/Sal,1.2-Subklons führte zu einer Reihe distinkter Banden (Abb.23,2), die im Größenbereich der HeLa snPI RNAs liegen (vergleiche Abb.23,1). Obwohl quantitative Unterschiede in der Intensität einzelner Banden zu dem mit isolierten Zellkernen erhaltenen Vergleichsspektrum deutlich sichtbar sind, zeigt eine nähere Analyse, daß beide RNA-Spektren qualitativ weitgehend iden-

tisch sind. Die in Abb.23,2 dargestellten in vitro transkribierten RNAs werden in einer Matrizen-abhängigen Reaktion synthetisiert, da in Gegenwart von 200 µg/ml Actinomycin D (Abb.23,3) lediglich Produkte erhalten wurden, die sich auch in Gegenwart des Plasmids ohne rDNA-Einschub (Abb.23,4) oder sogar in Abwesenheit von exogen zugesetzter DNA (Abb.23,5) erzeugen ließen.

Während die in vitro Transkription des zirkulären pEco/Sal,1.2-Plasmids mit einem zytoplasmatischen Extrakt zu einer Population hochmolekularer RNAs führte (Abb.23,6), wurden - bei der Verwendung der gleichen DNA-Matrize - durch einen Manley-Extrakt spezifische, niedermolekulare RNAs erzeugt (Abb.23,2). Diese RNA-Polymerase I-Produkte werden von der isolierten ribosomalen DNA im pEco/Sal,1.2-Subklon abgelesen.

Für die zuvor beschriebenen Transkriptionsuntersuchungen wurden zirkuläre Plasmide als DNA-Matrizen verwendet. Die Benutzung von mit Sal I linearisierten Plasmiden führte bei den Versuchen mit zytoplasmatischen Extrakten zu anderen Resultaten. Diese werden im folgenden beschrieben: Alle Transkriptionsansätze enthielten wiederum 200 µg/ml α -Amanitin, d.h., es bildeten sich nur RNA-Polymerase I-Transkripte.

Abb.24: 5-7 zeigt die Produkte, die in Gegenwart eines zytoplasmatischen Extrakts erzeugt wurden. Die in vitro Transkription des mit Sal I linearisierten pEco/Sal,1.2-Subklons führte zur Synthese von mindestens zwei Produkten (Abb.24,5). Da diese Produkte weder bei der Kontrollreaktion ohne DNA (Abb.24,7) noch bei der Transkription des linearisierten pUC 8-Plasmids (Abb.24,6) auftraten, müssen sie von der ribosomalen Sequenz innerhalb des pEco/Sal,1.2-Plasmids herrühren. Das ca. 730 Nukleotide große Produkt (vergleiche Abb.24,5) wurde auch von anderen Arbeitsgruppen gefunden (61-63). Seine Entstehung wird von diesen Autoren folgendermaßen erklärt: die Synthese des ca. 730 Nukleotide langen RNA-Polymerase I-Produkts wird am Startpunkt der 45S rRNA-Transkription (vergleiche Abb.12.) initiiert. Da die Sal I-Schnittstelle im pEco/Sal,1.2-Plasmid 730 Nukleotide vom Initiationspunkt der 45S rRNA-Transkription entfernt ist,

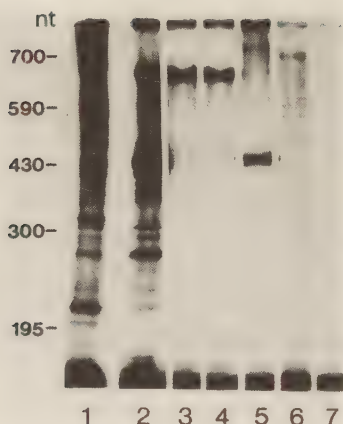


Abb.24: Elektrophoretische Auftrennung von RNA-Transkripten, die unter Verwendung von linearisierten Plasmiden als DNA-Matrizen synthetisiert wurden (4-10% SDS-Polyacrylamidgel)

Jeder Ansatz enthielt 200 µg/ml α-Amanitin.

Die Linearisierung der verwendeten Plasmide erfolgte durch die Restriktionsendonuklease Sal I.

- 1) HeLa snPI RNA, die in vitro in isolierten Zellkernen synthetisiert wurde (Vorbehandlung der Zellen mit 0.040 µg/ml Actinomycin D).
- A) In vitro Transkriptionen mit Hilfe eines Manley-Extrakts:
 - 2) RNA-Synthese in Gegenwart des linearisierten pEco/Sal,1.2-Plasmids.
 - 3) Transkriptionsprodukte des linearisierten pUC 8 -Plasmids (ohne rDNA-Einschub).
 - 4) Kontrollreaktion: der Ansatz enthielt keine exogen zugefügte DNA.
- B) In vitro Transkriptionen unter Verwendung eines zytoplasmatischen Extrakts:
 - 5) Transkription in Gegenwart des linearisierten pEco/Sal,1.2-Plasmids.
 - 6) RNA-Synthese unter Verwendung des linearisierten pUC 8 -Plasmids als Matrize.
 - 7) Kontrollreaktion: keine exogen zugefügten DNA-Moleküle im Ansatz.

kann diese RNA eine maximale Länge von ca. 730 Nukleotiden erreichen, bevor die Transkription an den freien DNA-Enden ausläuft. Dieses RNA-Molekül wird deshalb auch als Auslaufprodukt oder "run-off"-Transkript bezeichnet.

Neben diesem "run-off"-Produkt ist in Abb.24,5 noch eine zweite Bande (Größe: ca. 420 Nukleotide) zu erkennen. Dieses RNA-Molekül stellt möglicherweise ein Prozessierungsprodukt dar. Financesek et al. (57) haben eine mutmaßliche Prozessierungsstelle beschrieben, die ca. 415 Nukleotide vom Initiationspunkt der HeLa 45S rRNA entfernt ist.

Hingegen führte die in vitro Transkription mit dem Manley-Extrakt (Abb.24: 2-4) zu keinen neuen Resultaten. Die RNA-Produkte, die mit einem linearisierten pEco/Sal,1.2-Plasmid erzeugt wurden (Abb.24,2), stimmen mit denen überein, die in Gegenwart des zirkulären Plasmids transkribiert wurden (vergleiche Abb.23,2). Die Vergleiche mit der Kontrolle (Abb.24,4) und der in vitro RNA-Synthese mit linearisiertem pUC 8 -Plasmid (Abb.24,3) belegen, daß das 1.2 kb Eco RI/Sal I-Fragment innerhalb des pEco/Sal,1.2-Subklons für die Synthese aller zusätzlichen RNAs in Abb.24,2 verantwortlich ist.

Bei der in vitro Transkription der mit Sal I linearisierten pEco/Sal,1.2-DNA-Matrize in Gegenwart eines Manley-Extrakts wird anscheinend kein 730 Nukleotide langes "run-off"-Transkript gebildet (Abb.24,2 und Abb.24,5). Es ist daher wahrscheinlich, daß die niedermolekularen RNAs in Abb.24,2 schon Prozessierungsprodukte darstellen, deren Auftreten von der Anwesenheit von Kernextraktkomponenten bestimmt wird.

Andererseits könnten diese niedermolekularen RNA-Spezies an mehreren Stellen im ETS-Bereich des pEco/Sal,1.2-Plasmids initiiert und bis zur Sal I-Schnittstelle transkribiert werden. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden in vitro Transkriptionsstudien mit isolierten ribosomalen Fragmenten mit Hilfe eines Manley-Extrakts durchgeführt.

3.10.2. Transkription von isolierten ribosomalen Fragmenten mit einem Manley-Extrakt:

Die Benutzung des 785 bp langen Sau 3A-Fragments (Abb.14) als Matrize führte zu spezifischen Transkriptionsprodukten, die zwischen 220 und 340 Nukleotiden Länge liegen (Abb.25,5) und auch bei der Transkription des linearisierten pEco/Sal,1.2-Subklons erhalten wurden (vergleiche Abb.25,1). Weiterhin sind noch einige schwache Banden zu erkennen (zwischen 400 und 650 Nukleotiden), die jedoch bereits in der Kontrollreaktion (Transkription ohne exogene DNA; Abb.25,2) präsent sind. Da das verwendete, lineare Sau 3A-Fragment ca. 375 Nukleotide externen transkribierten "spacer" besitzt (vergleiche Abb.14.), beträgt die maximale Länge eines ribosomalen Transkripts 375 Nukleotide, vorausgesetzt, es startet am 45S rRNA-Initiationspunkt. Jedoch sind die in Abb.25,5 gezeigten RNAs alle kürzer als ein solches "run-off"-Transkript. Eine mögliche Erklärung ist, daß die 220-340 Nukleotide langen RNAs Prozessierungsprodukte sind, die am 45S rRNA-Startpunkt beginnen. Andererseits könnten diese Produkte jedoch an verschiedenen Stellen initiieren und am 3'-Ende des 785 bp-Fragments auslaufen.

Die in vitro Transkription des 536 bp Hinf I/Sal I-Fragments (Abb.12.) führte zu einigen schwachen Banden (Abb.25,4), die wahrscheinlich von unspezifischer Initiation der RNA-Polymerase I herrühren; jedoch nicht zu dem RNA-Spektrum, das bei der Transkription des pEco/Sal,1.2-Subklons auftrat (vergleiche Abb.25,1). Somit existieren zumindest in dem 536 bp Hinf I/Sal I-Fragment keine Initiationsstellen für die niedermolekularen RNAs in Abb.25,1 (vergleiche 55,56).

Durch den Vergleich mit der Kontrollreaktion (Abb.25,2) wird deutlich, daß auch bei Verwendung des 195 bp Hinf I-Fragments (Abb.12., dieses Fragment beginnt ca. 30 Nukleotide vor dem 45S rRNA-Initiationspunkt) keine RNA-Moleküle initiiert werden (Abb.25,3). Möglicherweise fungieren Sequenzen im nicht transkribierten "spacer", die mehr als 30 Nukleotide vor dem 45S rRNA-Start liegen, als Erkennungsstelle (Promotor) für RNA-Polymerase I. Diese Vermutung wird durch andere Arbeitsgruppen unterstützt, wonach RNA-

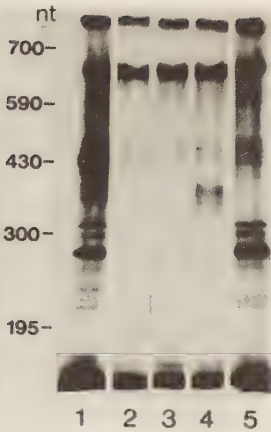


Abb.25: RNA-Synthese unter Verwendung von isolierten ribosomalen DNA-Fragmenten. Die Auftrennung der RNA-Moleküle erfolgte in einem 4-10% SDS-Polyacrylamidgel.

Die Transkriptionen wurden mit Hilfe eines Manley-Extrakts durchgeführt.

Alle gezeigten Transkripte sind RNA-Polymerase I-Produkte, da jeder Ansatz 200 µg/ml α -Amanitin enthielt.

Für die in vitro Transkriptionen kamen folgende DNA-Matrizen zum Einsatz:

- 1) pEco/Sal,1.2-Plasmid, das mit Sal I linearisiert wurde.
- 2) Kontrolle: der Ansatz enthielt keine exogen zugefügte DNA.
- 3) 195 bp Hinf I-Fragment (vergleiche Abb.12.).
- 4) 536 bp Hinf I/Sal I-Fragment (vergleiche Abb.12.).
- 5) 785 bp Sau 3A-Fragment (vergleiche Abb.14.).

Polymerase I-Promotoren zwischen -74 und -39 (Maus, 55) und -145 und +16 (Krallenfrosch *X.laevis*, 64) liegen (Die Position 0 steht für den 45S rRNA-Start). Anscheinend existieren auch im 195 bp Hinf I-Fragment keine zusätzlichen Initiationsstellen für die niedermolekularen RNA-Moleküle, die in Abb.25,1 dargestellt sind.

Aus den beschriebenen Experimenten läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß die niedermolekularen RNA-Polymerase I-Produkte, die mit Hilfe eines Manley-Extrakts von der pEco/Sal,1.2-DNA-Matrize transkribiert wurden (snPI RNAs), sehr wahrscheinlich Prozessierungsprodukte sind.

3.11. In vivo Synthese von HeLa snPI RNAs:

Um auszuschließen, daß snPI RNA-Moleküle in vitro Artefakte sind, mußte die Synthese von snPI RNAs auch unter in vivo Bedingungen nachgewiesen werden.

Nach einer einstündigen Markierung mit ^{32}P -Orthophosphat wurde aus HeLa-Zellen die gesamte Kern-RNA isoliert. Die radioaktiv markierten Ribonukleinsäuren wurden in Hybridisierungslösung bei 42°C mit zwei Nitrozellulosefiltern inkubiert, die mit jeweils 5 μg pEco/Sal,1.2-DNA beladen waren. Die über Wasserstoffbrückenbindungen angelagerten RNAs ließen sich durch einen Hitzeschritt (3 Minuten bei 95°C) von der DNA ablösen und auf einem SDS-Polyacrylamidgel auftrennen. Das dabei erhaltene RNA-Spektrum ist in Abb.26. dargestellt.

Für das in Abb.26,2 gezeigte RNA-Muster wurden die HeLa-Zellen vor der radioaktiven Markierung mit 0.040 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Actinomycin D inkubiert, was zu einer Inhibierung der ribosomalen RNA-Synthese führte.

Abb.26,1 zeigt das typische HeLa snPI RNA-Spektrum, welches durch eine in vitro Transkription mit Zellkernen in Gegenwart von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ α -Amanitin erzeugt wurde. Der Zellkernisolierung ging eine Behandlung der HeLa-Zellen mit 0.040 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Actinomycin D voran.

Aus dem Vergleich der Spektren in Abb.26,1 und Abb.26,2 ergibt sich, daß die meisten snPI RNA-Spezies auch unter in vivo Bedingungen synthetisiert werden. Die snPI RNA-Moleküle 2, 4, 5, 6, 7 und 8 sind in Abb.26,2 deutlich zu erkennen. Jedoch ist die snPI RNA-Spezies Nr.1, die in Abb.26,1 die prominenteste Bande darstellt, in vivo in dieser Intensität nicht nachweisbar (Abb.26,2 zeigt an der Position der Spezies 1 nur eine äußerst schwache Bande). Ein weiterer Unterschied wird durch das Verhalten der snPI RNA Nr.3 deutlich: Während dieses RNA-Molekül in vivo fast nicht nachweisbar ist, wird es in vitro deutlich markiert; hingegen wird das Molekül Nr.2 in beiden Systemen ungefähr in gleichen Mengen synthetisiert. Insgesamt bestätigen diese unter in vivo Bedingungen erhaltenen snPI RNA-Variationen frühere Ergebnisse, die durch differen-

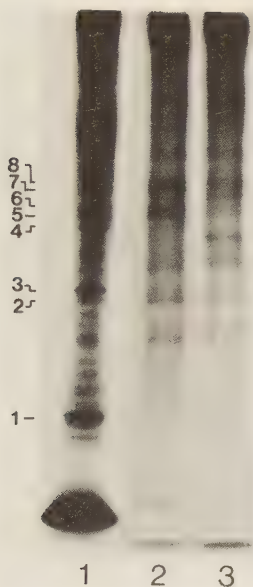


Abb.26: Autoradiogramme der elektro-
phoretischen Auftrennung von
in vivo synthetisierter HeLa
snPI RNA

HeLa-Zellen wurden mit ^{32}P -
Orthophosphat radioaktiv
markiert und die gereinigte
Kern-RNA an filtergebundene
pEco/Sal,1.2-DNA hybridisiert.
Die Auftrennung der nach einem
Hitzeschritt aus den RNA-DNA-
Hybriden freigesetzten RNA-
Molekülen erfolgte in einem
4-10% SDS-Polyacrylamidgel.

- 1) HeLa snPI RNAs, die unter in vitro Bedingungen in Gegen-
wart von 200 $\mu\text{g/ml}$ α -Amanitin in isolierten Zellkernen
synthetisiert wurden (Die HeLa-Zellen wurden vor der
Isolierung der Kerne mit 0.040 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D vor-
inkubiert). Die prominentesten Moleküle sind numeriert (1-8).
- 2) Gelelektrophoretische Analyse von RNA-Molekülen, die nach
Hybridisierung an den pEco/Sal,1.2-Subklon zurückgewonnen
wurden (In vivo transkribierte HeLa snPI RNAs). Vor der
 ^{32}P -Markierung erfolgte eine Inkubation der HeLa-Zellen
mit 0.040 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D.
- 3) Wie 2), allerdings ohne Actinomycin D-Vorbehandlung.

tielle Zellfraktionierung erhalten wurden (18).

Abb.26,3 zeigt die unter in vivo Bedingungen transkribierten
snPI RNAs, die ohne eine Actinomycin D-Vorbehandlung synthe-
tisiert wurden. Dieses Spektrum entspricht qualitativ dem
RNA-Muster in Abb.26,2. Allerdings werden die snPI RNA-
Moleküle 5, 6, 7 und 8 in einem weitaus geringeren Ausmaß
synthetisiert. Außerdem besitzt das RNA-Muster in Abb.26,3
eine Bande (zwischen den Spezies 3 und 4), die stärker
markiert ist als die entsprechende Bande in Abb.26,2.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß snPI RNAs auch ohne
Actinomycin D-Vorbehandlung in intakten Zellen synthetisiert

werden und keinen Artefakt der Zellkernpräparation oder der in vitro RNA-Synthesebedingungen darstellen.

4. Diskussion:

Die vorliegende Arbeit untersucht die Herkunft und die mögliche biologische Funktion der snPI RNA-Moleküle.

Zunächst wurden Experimente durchgeführt, die der Beantwortung der Frage dienten, ob eine mögliche Beziehung zwischen den snPI RNAs und den snRNAs existiert, die beide den niedermolekularen Kern-RNAs zuzurechnen sind.

Aufgrund von Analysen ihrer Oligonukleotidzusammensetzung konnte gezeigt werden, daß zwischen den snPI RNAs und den snRNA-Spezies U_1 und U_2 keine Beziehung besteht. Außerdem wird zumindest das snRNA-Molekül U_1 , im Gegensatz zu den snPI RNAs, möglicherweise von RNA-Polymerase II transkribiert (10,11).

Auch die snRNA U_3 , die an der Prozessierung von ribosomaler RNA beteiligt zu sein scheint (7,65), hat keine gemeinsamen Sequenzen mit den snPI RNAs, weil sich die Häufigkeit von bestimmten Oligonukleotiden in den analysierten Maus snPI RNAs nicht mit der U_3 -Sequenz in Einklang bringen läßt (66). Außerdem bindet HeLa U_3 RNA nicht an menschliche DNA-Sequenzen, die für snPI RNA codieren (67).

Die folgenden Befunde sprechen ebenfalls gegen eine Beziehung zwischen den beiden RNA-Klassen:

- 1) HeLa snPI RNAs hybridisieren nicht an menschliche snRNA-Gene (67).
- 2) SnPI RNAs zeigen im Gegensatz zu snRNAs eine ausgeprägte Spezifität (19).

Neben der Spezifität werden snPI RNAs noch durch zwei weitere bemerkenswerte Befunde charakterisiert:

- 1) Die snPI RNA-Moleküle werden von RNA-Polymerase I transkribiert.
- 2) Die aus Maus-Zellen isolierten snPI RNAs weisen repetitive Sequenzen auf.

Zusammengenommen führten diese Merkmale zunächst zu der An-

nahme, daß snPI RNA-Gene möglicherweise im sogenannten nicht transkribierten "spacer" lokalisiert sind. Diese Region der ribosomalen DNA beinhaltet ebenfalls repetitive Sequenzen (39-43,68,69) und divergiert zwischen verschiedenen Spezies (44-47).

Aus den beschriebenen Experimenten folgt jedoch, daß innerhalb der menschlichen ribosomalen Gene (λ HR,a, vergleiche Abb.8) ausschließlich Sequenzen des externen transkribierten "spacers" (ETS) mit den snPI RNAs hybridisieren. Diese Lokalisation der snPI RNA-Sequenzen impliziert, daß diese niedermolekularen RNAs keine Transkripte des nicht transkribierten "spacers" (NTS) darstellen, die von mehreren Arbeitsgruppen in verschiedenen Organismen beschrieben wurden (48-53).

Somit stehen HeLa snPI RNAs auch in keinem Zusammenhang mit den hochrepetitiven Alu-Sequenzen, die im nicht transkribierten "spacer" in mehreren Kopien vorkommen (68). Dieser Punkt wird auch durch die Veröffentlichung von Miesfeld und Arnheim unterstützt (63), wonach die Initiationsregion des menschlichen ribosomalen Gens keine Homologien zu anderen ribosomalen Sequenzen zeigt. Die örtliche Festlegung der snPI RNA-Sequenzen bietet auch eine Erklärung für die Speziespezifität der snPI RNAs: DNA-Sequenzanalysen verdeutlichen, daß es im Bereich der snPI RNA-Gene fast keine Homologien zwischen verschiedenen Säugern gibt (57, 69,70).

Die Anordnung der snPI RNA-Gene (Abb.22.) und die Transkription vom gleichen DNA-Strang wie 45S rRNA deuten darauf hin, daß snPI RNAs frühe Prozessierungsprodukte dieser ribosomalen RNA repräsentieren. Diese Hypothese wird durch in vitro Transkription des pEco/Sal,1.2-Subklons mit löslichen Zellextrakten unterstützt. Die Transkription mit einem aus ganzen Zellen präparierten Extrakt (Manley-Extrakt) führte zu einem RNA-Spektrum, das mit dem mit isolierten Zellkernen erhaltenen snPI RNA-Muster nahezu identisch ist (vergleiche Abb.23.). Transkriptionsexperimente mit isolierten ribosomalen Fragmenten lassen es als wahrscheinlich erscheinen, daß die mit dem Manley-Extrakt synthetisierten RNA-Moleküle ebenfalls

Prozessierungsprodukte der 45S prä-rRNA sind und keinesfalls an verschiedenen Stellen initiiert werden.

Bei der Verwendung eines zytoplasmatischen Extrakts führte die Transkription des linearisierten pEco/Sal,1.2-Plasmids neben dem erwarteten "run-off"-Produkt zu einem weiteren RNA-Molekül, das möglicherweise ein prozessiertes Transkript darstellt. Hingegen wurden bei der Transkription des zirkulären pEco/Sal,1.2-Plasmids mit einem zytoplasmatischen Extrakt keine prozessierten RNA-Spezies nachgewiesen. Da für diese beiden Experimente zytoplasmatische Extrakte aus zwei verschiedenen Präparationen eingesetzt wurden, scheint es vom Ausmaß der Zellkernbeschädigung abzuhängen, welches RNA-Muster erhalten wird. Je mehr Kerne bei der Herstellung eines zytoplasmatischen Extrakts beschädigt werden, umso mehr gleicht dieser Extrakt einem aus ganzen Zellen präparierten Manley-Extrakt und führt damit zur Erzeugung von prozessierten RNA-Molekülen. Die Annahme, daß das Transkriptionsergebnis von Extraktpräparation zu Extraktpräparation schwankt, wird durch die sehr unterschiedlichen RNA-Spektren untermauert, die von verschiedenen Gruppen bei der Transkription vergleichbarer ribosomaler DNA-Sequenzen erhalten werden (26,55,56).

Für HeLa 45S rRNA wurde eine mutmaßliche Prozessierungsstelle beschrieben, die ca. 415 Nukleotide vom Initiationspunkt der ribosomalen RNA entfernt liegt (57). Da HeLa snPI RNAs zum großen Teil über diese Prozessierungsstelle hinweglaufen, scheinen sie Produkte eines bisher noch nicht beobachteten Prozessierungsschemas zu sein. Daß der Beginn der 45S rRNA ein Ort starker Prozessierungsaktivität ist, wird durch die beobachtete Heterogenität der 5'-Enden dieser ribosomalen RNA in Rattenzellen unterstützt (71).

Eine alternative Möglichkeit ist, daß snPI RNAs Derivate der 24S rRNA sind, die beim ersten Reifungsschritt der 45S rRNA abgespalten wird und den gesamten externen transkribierten "spacer" darstellt (72).

Dies würde erklären, warum diejenigen prozessierten 45S rRNA-Moleküle, die bei der Abspaltung der snPI RNAs von der pri-

mären 45S rRNA entstehen sollten, bisher nicht nachgewiesen wurden.

Eine Auswertung der DNA-Sequenzen an der Grenzregion, die vom Gen der HeLa snPI RNA Nr.1 und den Genen der HeLa snPI RNA-Moleküle 2-7 gebildet wird (Abb.22.), läßt erkennen, daß sich an diesem Ort (Position +211 - +217) ein Palindrom befindet (57). Überraschenderweise trifft man diese Sequenz am Startpunkt der ribosomalen RNA des Krallenfrosches *X.laevis* wieder (Position +2 - -8). Neben dieser Sequenz enthält der 5'-Bereich des menschlichen 45S rRNA-Gens noch einige zusätzliche, benachbarte Palindrome (57). Die Bedeutung dieser Sequenzen für die Synthese der snPI RNAs ist unklar; daß auch sie möglicherweise Prozessierungssignale repräsentieren, ist jedoch nicht auszuschließen.

Da snPI RNAs als mutmaßliche Prozessierungsprodukte auch unter in vivo Bedingungen synthetisiert werden, erfolgt ihre in vitro Erzeugung in isolierten Zellkernen und in löslichen Extrakten anscheinend durch korrektes Prozessieren.

Korrektes Prozessieren von RNA-Molekülen ist ein Prozeß, der bisher nur in sehr wenigen Fällen beobachtet wurde (73, 74). Wahrscheinlich sind für die meisten Prozessierungsprozesse Bedingungen erforderlich, die bisher nur in intakten Zellen angetroffen wurden. Es ist deshalb bemerkenswert, daß für das frühe Prozessieren am 5'-Ende der 45S rRNA anscheinend weder zytoplasmatische Faktoren noch intakte zelluläre Strukturen erforderlich sind. Damit beruht die in vitro Synthese von snPI RNAs sehr wahrscheinlich auf einem der wenigen bisher bekannten Beispiele, bei denen korrekte Prozessierungsvorgänge in vitro zu beobachten sind.

Gegen einen Zusammenhang zwischen snPI RNA und 45S rRNA sprachen zunächst die ursprünglich gefundene nukleoplasmatische Lokalisation der snPI RNA-Moleküle und ihre Resistenz gegen niedrige Konzentrationen von Actinomycin D (0.040 µg/ml, 18). Jedoch gibt es Berichte, nach denen Actinomycin D nur die weitere Synthese ribosomaler RNA inhibiert, während das Prozessieren zum Teil unbeeinflusst fortläuft (24). Das Vorkommen der snPI RNAs in der nukleoplasmatischen Fraktion ist sehr wahrscheinlich eine Folge der Zellkernfraktionierung, da die Nukleoli durch die Einwirkung von 0.5 M NaCl starken

Extraktionsbedingungen ausgesetzt werden und dieser Effekt möglicherweise durch die DNase-Behandlung verstärkt wird.

Neben der Erzeugung der snPI RNAs durch Abspaltungen vom externen transkribierten "spacer" ist noch ein weiterer Mechanismus vorstellbar, der das Vorhandensein dieser niedermolekularen RNA-Moleküle erklären würde:

Danach wären die snPI RNAs Produkte einer frühzeitigen Termination der 45S rRNA-Synthese. Einen vergleichbaren Fall stellt die Attenuation der Transkription von Bakterienoperons dar; allerdings ist dabei die frühzeitige Termination der polycistronischen mRNA mit der Translation des 5'-Endes dieser mRNA gekoppelt. Da jedoch 45S rRNA nicht translatiert wird, müßten andere Mechanismen für diese mutmaßliche frühe Termination ihrer Synthese erforderlich sein. Eine Möglichkeit ist, daß die bereits erwähnten Palindrome als Terminationssignale wirken.

Terminationseignisse, die nicht das 3'-Ende der 45S rRNA betreffen, sind von mehreren Autoren beobachtet worden (53, 75). Jedoch befinden sich die entsprechenden Terminationsorte im 5'-flankierenden nicht transkribierten "spacer".

Daß snPI RNAs auch in vivo vorhanden sind, wurde bereits mit Hilfe von Zellfraktionierungen nachgewiesen (18). Dieser Befund ließ sich durch Hybridisierungsstudien mit in vivo markierten Kern-RNAs noch einmal eindrucksvoll bestätigt. Die snPI RNAs sind somit sicher keine artifiziellen Produkte, die auf in vitro Bedingungen zurückzuführen sind.

Für die Erzeugung der snPI RNAs sind zwei mögliche Modelle erwähnt worden.

Aus den angeführten Ergebnissen folgt, daß snPI RNAs höchstwahrscheinlich Prozessierungsprodukte sind, die durch spezifische Abspaltungen vom externen transkribierten "spacer" entstehen. Die Existenz solcher Produkte wurde zwar postuliert (5), sie wurden allerdings bisher nicht nachgewiesen. Die snPI RNA-Synthese könnte somit zu einem besseren Verständnis des komplexen Reifungsprozesses der 45S rRNA beitragen.

Nach wie vor unklar bleibt die Frage nach der Funktion der snPI RNAs.

Da die für snPI RNAs codierenden DNA-Sequenzen ausschließlich am 5'-Ende des externen transkribierten "spacers" liegen, repräsentieren die snPI RNA-Moleküle wahrscheinlich keine allgemeinen Abbauprodukte der transkribierten "spacer"-Sequenzen. SnPI RNA-Sequenzen wurden an keiner zusätzlichen Position innerhalb der 16.6 kb großen Insertion des λ HR,a-Klons gefunden. Diese spezifische Lokalisation der snPI RNA-Gene deutet auf eine mögliche Funktion der snPI RNAs hin.

Eine Möglichkeit ist, daß snPI RNAs eine Rolle bei der Reifung der 45S rRNA spielen. So könnten snPI RNA-Moleküle über Wasserstoffbrückenbindungen an die Grenzregionen, an denen "reife" ribosomale RNAs (28S rRNA, 18S rRNA, 5.8S rRNA) und transkribierte "spacer" zusammentreffen, binden und als Erkennungssignale für Prozessierungsenzyme wirken. Enzymaktivitäten, die spezifisch für doppelsträngige RNA sind, wurden in Nukleoli eukaryotischer Zellen nachgewiesen (76). Eine Beteiligung dieser Enzyme am Reifungsprozeß der 45S rRNA konnte allerdings nicht bestätigt werden.

Schließlich ist es jedoch nicht auszuschließen, daß snPI RNAs selbst keine Funktion haben, sondern das Ergebnis von bisher nicht entdeckten Kontrollvorgängen (frühzeitige Termination der 45S rRNA-Synthese und spezifisches Prozessieren am 5'-Ende der 45S rRNA) sind, die in der Nähe der Initiationsregion der 45S rRNA eingreifen.

Diese Annahme wird gestützt durch die beobachtete Zunahme der Synthese der HeLa snPI RNA Nr.1 nach Blockierung der weiter entfernt liegenden rDNA-Sequenzen durch niedrige Konzentrationen von Actinomycin D.

In jedem Fall sollten die Untersuchungen der snPI RNA-Synthese einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Transkriptionsvorganges der ribosomalen RNA leisten.

Darüber hinaus stellt die in vitro Synthese von snPI RNA ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung der von RNA-Polymerase I katalysierten RNA-Synthese und die dabei

zusätzlich zur RNA-Polymerase selbst benötigten Protein-faktoren dar.

5. Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit wurden die Transkription der snPI RNA-Gene und ihre Lokalisation innerhalb der ribosomalen DNA-Sequenzen untersucht.

Aus der Analyse von RNase T₁-Verdauungsmustern (Oligonukleotidanalysen) folgt, daß keine Beziehung zwischen den snPI RNAs und den Hauptspezies der snRNAs besteht, die beide den niedermolekularen Kern-RNAs zuzurechnen sind.

Studien zur Lokalisation der für snPI RNA codierenden Sequenzen in Maus-Zellen deuteten zunächst darauf hin, daß die snPI RNA-Gene möglicherweise in den sogenannten nicht transkribierten Zwischensequenzen ("nontranscribed spacer sequences", NTS) liegen. Durch die Verlegung des Initiationspunktes der Maus 45S rRNA-Synthese wurde diese örtliche Festlegung der snPI RNA-Gene jedoch in Frage gestellt. Genauere Lokalisationsuntersuchungen, die mit Hilfe des isolierten Klons menschlicher ribosomaler DNA durchgeführt wurden, zeigten schließlich, daß snPI RNA-Sequenzen ausschließlich am 5'-Ende der externen transkribierten Zwischensequenzen ("external transcribed spacer sequences", ETS) zu finden sind; also innerhalb der 45S rRNA-Transkriptionseinheit.

Weiterhin wird für die Synthese der snPI RNAs der gleiche codogene DNA-Strang benutzt, der auch für die Synthese der 45S rRNA als Matrize dient.

Die Anordnung der snPI RNA-Sequenzen und die Transkription vom gleichen DNA-Strang wie 45S rRNA lassen es als wahrscheinlich erscheinen, daß snPI RNAs die Produkte eines bisher nicht beobachteten frühen Prozessierungsablaufes der ribosomalen 45S rRNA darstellen.

Diese Hypothese wird durch in vitro Transkriptionsstudien mit klonierten ribosomalen DNA-Sequenzen unterstützt, die zeigen, daß der Beginn des externen transkribierten "spacers" eine Region starker Prozessierungsaktivität ist.

Da snPI RNAs auch unter in vivo Bedingungen synthetisiert werden, repräsentieren sie keine artifiziellen Produkte, die aufgrund der in vivo Bedingungen auftreten.

Neben der Erzeugung durch frühe Prozessierungsereignisse wird die Möglichkeit, daß snPI RNAs aufgrund vorzeitiger Terminationsreaktionen der 45S rRNA-Transkription erzeugt werden, diskutiert.

6. Literaturverzeichnis:

- 1) Watson, J.D. und Crick, F.H.C. (1953) Nature 171, 737-738
- 2) Crick, F.H.C. (1958) Symp. Soc. Exp. Biol. The biological replication of macromolecules XII, 138
- 3) Darnell, J.E. (1982) Nature 297, 365-371
- 4) Cohen, S., Chang, A., Boyer, H. und Helling, R. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3240-3244
- 5) Lewin, B.M. (1980) Gene Expression 2, Second Edition, John Wiley & Sons
- 6) Weinberg, R.A. und Penman, S. (1968) J. Mol. Biol. 38, 289-304
- 7) Zieve, G. und Penman, S. (1976) Cell 8, 19-32
- 8) Busch, H., Reddy, R., Rothblum, L. und Choi, Y.C. (1982) Annu. Rev. Biochem. 51, 617-654
- 9) Zieve, G., Benecke, B.J. und Penman, S. (1977) Biochemistry 16, 4520-4525
- 10) Roop, D.R., Kristo, P., Stumph, W.E., Tsai, M.J. und O'Malley, B.W. (1981) Cell 23, 671-680
- 11) Murphy, J.T., Burgess, R.R., Dahlberg, J.E. und Lund, E. (1982) Cell 29, 265
- 12) Lerner, M.R. und Steitz, J.A. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 5495
- 13) Rogers, J. und Wall, R. (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 1877-1879
- 14) Ohshima, Y., Itoh, M., Okada, N. und Miyata, T. (1981) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 4471
- 15) Reichel, R. und Benecke, B.J. (1980) Nucl. Acids Res. 8, 225-234
- 16) Ullu, F., Murphy, S. und Melli, M. (1982) Cell 29, 195-201
- 17) Walter, P. und Blobel, G. (1982) Nature 299, 691-698
- 18) Benecke, B.J. und Penman, S. (1977) Cell 12, 939-946
- 19) Benecke, B.J. und Penman, S. (1979) J. Cell Biol. 80, 778-783
- 20) Puck, T.T., Marcus, P.J. und Cieciura, S.J. (1956) J. Exp. Med. 103, 273-284
- 21) Todaro, G. und Green, H. (1963) J. Cell Biol. 17, 299-313
- 22) Earle, W.R. (1943) J. Nat. Cancer Inst. 4, 165
- 23) Maxwell, J.H., Maxwell, F. und Hahn, W.E. (1977) Nucl. Acids Res. 4, 241-246
- 24) Penman, S. (1966) J. Mol. Biol. 17, 117-130

- 25) Monstein, H.J. und Philipson, L. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 4239-4250
- 26) Miller, K.G. und Sollner-Webb, B. (1981) Cell 27, 165-174
- 27) Manley, J.L., Fire, A., Cano, A., Sharp, P.A. und Gefter, M.L. (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 3855-3859
- 28) Perry, R.P. (1963) Exp. Cell Res. 29, 400-406
- 29) Lawn, R.M., Fritsch, E.F., Parker, R.C., Blake, G. und Maniatis, T. (1978) Cell 15, 1157-1174
- 30) Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacey, E., Lauer, J., O'Connell, C., Quon, D., Sim, G.K. und Efstratiadis, A. (1978) Cell 15, 687-701
- 31) Blattner, F.R., Williams, B.G., Blechl, A.E., Denison-Thompson, K., Faber, H.E., Furlong, L.A., Grunwald, D.J., Kiefer, D.C., Moore, D.D., Schumm, J.W., Sheldon, E.L. und Smithies, O. (1977) Science 196, 161-169
- 32) Benton, W.R. und Davies, R.W. (1977) Science 196, 180-182
- 33) Denhardt, D.T. (1966) Biochem. Biophys. Res. Comm. 23, 641-646
- 34) Seeburg, P.H., Shine, J., Marshall, J.A., Baxter, J.D., Goodman, H.M. (1977) Nature 220, 486
- 35) Vieira, J. und Messing, J. (1982) Gene 19, 259-268
- 36) Southern, E. Methods Enzymol. 69, 152
- 37) Smith, A.J.H. (1979) Nucl. Acids Res. 6, 831-848
- 38) Eliceiri, G.C. (1974) Cell 3, 11-14
- 39) Wellauer, P.K., Dawid, I.B., Brown, D.D. und Reeder, R.H. (1976) J. Mol. Biol. 105, 461-486
- 40) Wellauer, P.K., Reeder, R.H., Dawid I.B. und Brown, D.D. (1976) J. Mol. Biol. 105, 487-506
- 41) Boseley, P., Moss, T., Machter, M., Portmann, R. und Birnstiel, M.D. (1979) Cell 17, 19-31
- 42) Fedoroff, N.V. (1979) Cell 16, 697-710
- 43) Long, E.O. und Dawid, I.B. (1979) Nucl. Acids Res. 7, 205-215
- 44) Wellauer, P.K. und Dawid, I.B. (1979) J. Mol. Biol. 128, 289-303
- 45) Cory, S. und Adams, I.M. (1977) Cell 11, 795-805
- 46) Wellauer, P.K. und Dawid, I.B. (1977) Cell 10, 193-212
- 47) Wellauer, P.K. und Dawid, I.B. (1974) J. Mol. Biol. 89, 379-396
- 48) Scheer, U., Trendelenburg, M.F. und Franke, W.W. (1973) Exp. Cell Res. 80, 175-190
- 49) Scheer, U., Trendelenburg, M.F. und Franke, W.W. (1977) Chromosoma 60, 147-167

- 50) Runger, D., Achermann, H. und Crippa, M. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 3957-3961
- 51) Kohorn, B.D. und Rae, M.M. (1982) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 1501-1505
- 52) Miller, I.R., Hayward, D.C. und Glover, D.M. (1983) Nucl. Acids Res. 11, 11-19
- 53) Moss, T. (1983) Nature 302, 223-228
- 54) Bach, R., Grummt, I. und Allet, B. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 1559-1569
- 55) Grummt, I. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 6093-6102
- 56) Mishima, Y., Yamamoto, O., Kominami, R. und Muramatsu, M. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 6773-6785
- 57) Financsek, I., Mizumoto, K., Mishima, Y. und Muramatsu, M. (1982) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 3092-3096
- 58) Weil, P.A., Luse, D.S., Segall, J. und Roeder, R.G. (1979) Cell 18, 469-484
- 59) Grummt, I. (1981) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 727-731
- 60) Goldberg, I.H. und Friedman, P.A. (1971) Annu. Rev. Biochem. 40, 775-810
- 61) Mishima, Y., Financsek, I., Kominami, R. und Muramatsu, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10, 6659-6670
- 62) Grummt, I., Roth, E. und Paule, M.R. (1982) Nature 296, 173-174
- 63) Miesfeld, R. und Arnheim, N. (1982) Nucl. Acids Res. 10, 3933-3949
- 64) Moss, T. (1982) Cell 30, 835-842
- 65) Prestayko, A.W., Tonato, M. und Busch, H. (1970) J. Mol. Biol. 47, 505-515
- 66) Reddy, R., Henning, D. und Busch, H. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7029-7033
- 67) Reichel, R., Monstein, H.J., Jansen, H.W., Philipson, L. und Benecke, B.J. (1982) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 3106-3110
- 68) Higuchi, R., Stang, H.D., Browne, I.K., Martin, M.O., Huot, M., Lipeles, I. und Salser, W. (1981) Gene 15, 177-186
- 69) Kuehn, M. und Arnheim, N. (1983) Nucl. Acids Res. 11, 211-224
- 70) Rothblum, L.J., Reddy, R. und Cassidy, B. (1982) Nucl. Acids Res. 10, 7345-7362
- 71) Kominami, R. und Muramatsu, M. (1977) Nucl. Acids Res. 4, 229

- 72) Wellauer, P.K. und Dawid, I.B. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2827-2831
- 73) Manley, J.L., Sharp, P.A. und Gefter, M.L. (1982) J. Mol. Biol. 159, 581-599
- 74) Chen-Kiang, S., Wolgemuth, O.J., Hsu, M.T. und Darnell, J.E. (1982) Cell 28, 575-584
- 75) Bakken, A., Morgan, G., Sollner-Webb, B., Roan, J., Busby, S. und Reeder, R.H. (1982) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 56-60
- 76) Grummt, I., Hall, S.H. und Crouch, R.J. (1979) Eur. J. Biochem. 94, 437-444

Lebenslauf:

- 18.2.1956 geboren in Frankenberg als Sohn des Maschinen-
schlossers Rolf Reichel und seiner Ehefrau
Renate, geb. Eichhorn
- 1962-1966 Besuch der Volksschule in Bochum-Werne
- 1966-1971 Besuch der Franz-Dinnendahl Realschule in
Bochum-Langendreer
- 1971 Einschreibung an der Fachoberschule für Technik
in Bochum (Fachrichtung Chemie)
- 28.5.1973 Erlangung der Fachhochschulreife
- 1973-1976 Studium der Chemie an der Gesamthochschule
in Essen
- 1976 Wechsel zur Ruhr-Universität Bochum
- 1976-1979 Chemiestudium an der Ruhr-Universität Bochum
- 15.11.1979 Erlangung des Grades eines Diplomchemikers
- Januar 1980 Beginn der vorliegenden Dissertation am Lehr-
stuhl für Biochemie unter der Leitung von
Herrn PD Dr. B.J. Benecke

